



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

Departamento de Ingeniería Minera e Industrial (UCLM)

Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria (UCLM)

Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y Ambientales

## **ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE MERCURIO EN LA INTERFASE SUELO-PLANTA-ATMÓSFERA.**

LABORATORIO DE BIOGEOQUÍMICA DE METALES PESADOS – INSTITUTO DE GEOLOGÍA APLICADA

Memoria presentada por **Rocío Naharro Mimbrero**

para aspirar al grado de Doctor

Almadén, septiembre de 2019



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

Departamento de Ingeniería Minera e Industrial (UCLM).

Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria (UCLM).

Laboratorio de Biogeoquímica de Metales Pesados

Instituto de Geología Aplicada

José Angel Amorós Ortiz-Villajos, Profesor Titular del Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria de la Universidad de Castilla-La Mancha y Pablo León Higuera Higuera, Catedrático de Prospección e Investigación Minera del Departamento de Ingeniería Geológica y Minera de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICAN: Que los estudios descritos en la presente memoria bajo el título, “Estudio de la transferencia de mercurio en la interfase suelo-planta-atmósfera” que presenta la Ingeniera de Minas ROCÍO NAHARRO MIMBRERO para optar al Grado de Doctor, fueron realizados bajo nuestra dirección.

Y para que conste, firman la siguiente certificación en Ciudad Real, 16 de septiembre de 2019.

José Angel Amorós Ortiz-Villajos

UCLM

Pablo L. Higuera Higuera

UCLM



## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas a las que agradecerles su ayuda en la realización de esta Tesis, cada una de ellas han aportado su granito de arena tanto a nivel personal como profesional.

En un primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis: Pablo León Higuera, gracias a ti me inicié en el mundo de la investigación, un mundo muy bonito, el cual tiene mucho sacrificio, pero finalmente es muy reconfortante, agradecerte tu transmisión de conocimientos y experiencias, sin ti no hubiera sido posible la realización de esta Tesis y José Ángel Amorós, gracias porque desde la distancia me has aportado tus conocimientos en el mundo de la agronomía.

Agradecer también a todos los compañeros de laboratorio que he tenido durante estos años, en especial a José María Esbrí, gracias por todo tu conocimiento, experiencia y ayuda para que esta Tesis pudiera ser escrita y presentada y Eva M<sup>a</sup> García, gracias por tu ayuda a lo largo de estos años.

A mis padres, gracias por el apoyo y dedicación en todo lo que necesito.

A mi marido, gracias por la comprensión y el ánimo en todo lo que me propongo.

A mis familiares y amigos, en especial a Juan y Bárbara, gracias por dejarme hacer de vuestra casa, la casa de mi experimento.

Por último, quiero dedicar esta Tesis a mi abuelo, que estaría muy orgulloso de ver lo que he conseguido.



## INDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. EL MERCURIO.....	1
1.2. APLICACIONES DEL MERCURIO.....	2
1.3. TOXICIDAD DEL MERCURIO.....	3
1.4. EFECTOS AMBIENTALES DEL MERCURIO.....	5
1.5. MERCURIO EN SUELOS.....	7
1.6. MERCURIO EN PLANTAS.....	9
1.7. VEGETALES COMESTIBLES.....	10
1.8. DISTRITO MINERO DE ALMADÉN.....	11
1.9. ALMADENEJOS.....	17
1.10. PEÑALSORDO.....	19
1.11. DESCRIPCION DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO.....	20
1.11.1. Olivos.....	20
1.11.2. Vid. ....	23
1.12. OBJETIVOS.....	26
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. PRIMER EXPERIMENTO: CAPTACIÓN DE MERCURIO EN LA INTERFASE PLANTA- ATMÓSFERA.....	28
2.1.1. Objetivo.....	28
2.1.2. Selección de la zona y monitorización.....	28
2.1.3. Toma de muestras y preparación.....	30
2.2. SEGUNDO EXPERIMENTO: SITUACIÓN EXPERIMENTAL EN AMBIENTE CONFINADO (suelo-planta-atmósfera).....	30
2.2.1. Objetivo.....	30
2.2.2. Selección de la zona y monitorización.....	30
2.2.3. Toma de muestras y preparación.....	32
2.3. TERCER EXPERIMENTO: CAPTACIÓN DE MERCURIO EN CULTIVOS: ALTERNATIVA ENTRE LA CAPTACIÓN SUELO-PLANTA-ATMÓSFERA.....	32
2.3.1. Objetivo.....	32
2.3.2. Selección de la zona y monitorización.....	32
2.3.3. Toma de muestras y preparación.....	33
2.4. CUARTO EXPERIMENTO: DESORCIÓN DE MERCURIO EN CULTIVOS (OLIVO).....	35
2.4.1. Objetivo.....	35
2.4.2. Selección de la zona y monitorización.....	35
2.4.3. Toma de muestras y preparación.....	35
2.5. QUINTO EXPERIMENTO: ABSORCIÓN/DESORCIÓN DE MERCURIO EN AMBIENTE CONFINADO.....	36
2.5.1. Objetivo.....	36
2.5.2. Selección de la zona y monitorización.....	36
2.5.3. Toma de muestras y preparación.....	38
2.6. PROCEDIMIENTO ANALITICO.....	38
2.6.1. Mercurio total en muestras biológicas.....	38
2.6.2. Mediciones de MGT usando el equipo Tekran 2537B.....	38

2.6.3. Mediciones de MGT usando el equipo LUMEX RA-915+ .....	40
2.6.4. Adquisición de datos micrometeorológicos mediante una Estación meteorológica automática DAVIS VANTAGE PRO .....	41
2.6.5. Liofilización de muestras biológicas usando un equipo TELSTAR CRYODOS.....	41
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
3.1. Primer experimento: captación de mercurio en la interfase planta-atmósfera.....	43
3.2. Segundo experimento: situación experimental en ambiente confinado (suelo-planta-atmósfera).....	52
3.3. Tercer experimento: captación de mercurio en cultivos: alternativa entre la captación suelo-planta-atmósfera.....	58
3.4. Cuarto experimento: desorción de mercurio en cultivos (olivo) .....	75
3.4.1. Desorción del olivo procedente del primer experimento.....	75
3.4.2. Desorción de olivos procedentes del experimento 3.....	77
3.5. Quinto experimento: absorción/desorción de mercurio en ambiente confinado .....	78
3.5.1. Fase previa. ....	78
3.5.2. Fase de desorción inicial. ....	79
3.5.3. Fase de absorción.....	85
3.5.4. Discusión. ....	88
3.5.5. Conclusiones parciales .....	90
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>
4.1 Conclusiones parciales .....	91
4.2 Conclusiones generales .....	92
<b>5. Referencias Bibliográficas. ....</b>	<b>93</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo del mercurio en la biosfera y fenómenos de especiación ( $\text{Hg}^0 \leftrightarrow \text{CH}_3\text{Hg} \leftrightarrow \text{Hg}^{2+}$ ). 7	
<b>Figura 2:</b> Situación geográfica de Almadén.....	11
<b>Figura 3:</b> Flora del Distrito minero de Almadén.....	12
<b>Figura 4:</b> <i>Dehesa de Castilseras</i> . ....	13
<b>Figura 5:</b> Esquema geológico de la región de Almadén.....	14
<b>Figura 6:</b> Situación geológica y estratigráfica del distrito de Almadén.....	15
<b>Figura 7:</b> Situación de Almadenejos y mapa de detalle de la zona.....	18
<b>Figura 8:</b> Situación y mapa urbano de Peñalsordo.. ....	20
<b>Figura 9:</b> Aceitunas.....	23
<b>Figura 10:</b> Plantas de vid en cultivo intensivo.....	24
<b>Figura 11:</b> Cultivos de vid. ....	25
<b>Figura 12:</b> Situación de la depuradora EDAR Almadenejos. ....	29
<b>Figura 13:</b> Diseño del experimento de captación radicular.. ....	31
<b>Figura 14:</b> Diseño de los dos experimentos de desorción (A) y absorción (B).....	37
<b>Figura 15:</b> Tekran modelo 2537B. Analizador de mercurio vapor. ....	39
<b>Figura 16:</b> LUMEX RA-915+. Espectroscopia de absorción atómica .....	40
<b>Figura 17:</b> Estación meteorológica Davis Vantage Pro .....	41
<b>Figura 18:</b> Liofilizador dispuesto en el laboratorio del IGeA con detalle de las condiciones de trabajo .....	42
<b>Figura 19:</b> Gráfico temporal de la concentración de mercurio en hojas de olivos en Almadenejos.....	45
<b>Figura 20:</b> Evolución del MGT en la estación depuradora de Almadenejos en comparación con la evolución del Hg total en la hoja de los olivos. ....	47
<b>Figura 21:</b> Evolución de los principales parámetros micrometeorológicos durante el periodo de exposición de los olivos en Almadenejos.....	48
<b>Figura 22:</b> Dendrograma de variables del experimento de Almadenejos. ....	50
<b>Figura 23:</b> Comparación entre los olivos confinados en la caja de policarbonato y el olivo expuesto al mercurio ambiental de Almadén.....	54
<b>Figura 24:</b> Comparación entre el promedio de los dos olivos confinados en la caja de policarbonato y el olivo expuesto al mercurio ambiental de Almadén. ....	55
<b>Figura 25:</b> Gráfico de correlación entre el mercurio atmosférico y el mercurio en hoja. ....	56
<b>Figura 26:</b> Concentración de mercurio total en hojas de olivo en Almadenejos, según la cantidad de mercurio en el agua de riego. ....	61
<b>Figura 27:</b> Concentración de mercurio total en hojas de olivo en Almadenejos, según la edad de la hoja: vieja o joven.....	62
<b>Figura 28:</b> Concentración de mercurio total en hojas viejas y jóvenes de olivo en Ciudad Real y Almadenejos.....	63
<b>Figura 29:</b> Concentración de mercurio total en hojas de vid en Ciudad Real y Almadenejos. ...	63
<b>Figura 30:</b> Evolución de los contenidos de mercurio total obtenido en hojas de vid en Puertollano con relación al tiempo de exposición y en comparación con los datos de Ciudad Real.....	64
<b>Figura 31:</b> Mercurio gaseoso total en el área de las plantas los días 28/29 de julio de 2016. ....	65

<b>Figura 32:</b> Mercurio gaseoso total en el área de las plantas los días 22 y 23 de agosto de 2016.	65
<b>Figura 33:</b> Gráfico comparativo de datos de concentración de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) en suelo, raíz, tronco y hojas en vides de Almadenejos y Ciudad Real al finalizar el experimento de cuatro semanas...	67
<b>Figura 34:</b> Contenidos en mercurio total de las muestras de suelo (A), raíz (B), tallo (C) y hoja (D).....	69
<b>Figura 35:</b> Contenido en mercurio lixiviable (A) y otros parámetros edáficos de las muestras de suelo: materia orgánica (B), pH (C) y conductividad (D)..	70
<b>Figura 36:</b> Perfiles de desorción del mercurio contenido en las muestras de suelo que se regaron con mercurio (A) y sin mercurio (B).....	71
<b>Figura 37:</b> Dendrogramas de los parámetros edáficos del suelo y los contenidos de mercurio total y lixiviable (A) y de niveles de mercurio en distintos compartimentos del experimento (B).	73
<b>Figura 38:</b> Desorción de mercurio en el olivo 2 (A) y gráfico de evolución de MGT durante un ciclo de 24 horas en el lugar del experimento .....	76
<b>Figura 39:</b> Concentraciones de mercurio en hojas de olivo durante el experimento de desorción en Peñalsordo.....	78
<b>Figura 40:</b> Evolución diaria de la conductancia estomática de la planta durante dos días del mes de julio de 2018. ....	79
<b>Figura 41:</b> Estado inicial del experimento en el laboratorio de Cultivos Leñosos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (Ciudad Real). ....	80
<b>Figura 42:</b> Evolución temporal del mercurio medido dentro y fuera de la bolsa, y la diferencia entre ambos (ratio)..	81
<b>Figura 43:</b> Evolución del ratio de mercurio gaseoso en la bolsa durante dos ciclos diarios, 29 y 30 de abril de 2018.....	81
<b>Figura 44:</b> Evolución del flujo de mercurio, de la temperatura y de la humedad relativa durante el día 9 de mayo de 2018. ....	82
<b>Figura 45:</b> Evolución del flujo de mercurio, temperatura, humedad relativa y radiación solar durante el día 11 de mayo de 2018. ....	83
<b>Figura 46:</b> Evolución del flujo de mercurio, temperatura, humedad relativa y radiación solar durante los días 22 y 23 de mayo de 2018.....	84
<b>Figura 47:</b> Evolución del flujo de mercurio durante todo el tiempo del experimento. ....	85
<b>Figura 48:</b> Disposición del experimento en su fase de absorción.....	86
<b>Figura 49:</b> Ciclo diario de absorción/desorción del <i>Epipremnum aureum</i> expuesto a cantidades crecientes de mercurio gaseoso (24, 37 y $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) con luz solar y expuesta a $160 \text{ ng m}^{-3}$ en total oscuridad. ....	87

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Especificaciones del Modelo 2537B .....	39
<b>Tabla 2:</b> Valores de mercurio total en hojas de olivo (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el desarrollo del experimento en Almadenejos, comparados con algunos valores de referencia. ....	44
<b>Tabla 3:</b> Coeficientes de correlación de Pearson para todos los parámetros en experimentos de absorción en Almadenejos. ....	49
<b>Tabla 4:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento, junto con las principales referencias. ....	53
<b>Tabla 5:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas viejas de olivos en Almadenejos, según los nueve muestreos que se realizaron.....	58
<b>Tabla 6:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas jóvenes de olivos en Almadenejos, según los nueve muestreos que se realizaron. ....	59
<b>Tabla 7:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos en hojas de vid durante el experimento realizado en Almadenejos. ....	59
<b>Tabla 8:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas jóvenes y viejas de olivos de Ciudad Real y Almadenejos.....	59
<b>Tabla 9:</b> Valores de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos en hojas de vid durante el experimento realizado en Ciudad Real. ....	60
<b>Tabla 10:</b> Datos de mercurio total obtenido en vides con relación al tiempo de exposición, en Puertollano.....	60
<b>Tabla 11:</b> Datos de concentraciones de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) en tronco, suelo y raíz, en vides de Almadenejos y Ciudad Real.....	66
<b>Tabla 12:</b> Resumen estadístico de los datos de mercurio total en suelo, raíz, tallo y hojas, de mercurio lixiviable en los suelos y algunos parámetros edáficos del suelo (pH, conductividad eléctrica y materia orgánica).....	68
<b>Tabla 13:</b> Matriz de correlación entre las principales medidas realizadas. ....	72
<b>Tabla 14:</b> Valores de concentración de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) en hojas del Olivo 2 en Peñalsordo. ....	75
<b>Tabla 15:</b> Valores de concentración de mercurio total (en $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento de hojas jóvenes en Peñalsordo.....	77



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. EL MERCURIO

El mercurio es uno de los elementos de transición de la tabla periódica; se encuentra concretamente en el bloque D, su número atómico es 80 y su símbolo químico es Hg; este símbolo procede del latín "*hydrargyrum*". El nombre procede, a su vez, del griego "*hydrargyros*" (plata líquida). Hasta el siglo XVIII fue conocido como "*azogue*", palabra procedente del árabe. Posteriormente tomó este nombre con el que se conoce actualmente, ya que era el nombre de dios romano Mercurio, considerado protector de los caminantes y mensajero de los dioses (Hernández, 2007); la relación entre el dios y el elemento se estableció basándose en la rapidez con que ambos se mueven. El elemento es de color blanco plateado y tiene una densidad de  $13,6 \text{ g cm}^{-3}$ . El punto de fusión del mercurio es de  $234,32$  grados Kelvin ( $-38^\circ\text{C}$ ) y el punto de ebullición de  $629,88$  grados Kelvin ( $357^\circ\text{C}$ ), lo que supone que a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido. En esta forma, se trata de un líquido de aspecto claramente metálico, de color blanco-grisáceo plateado.

El mercurio es, así pues, el único metal en estado líquido a temperatura ambiente; tiene una alta presión de vapor y por ello, produce emisiones de vapor elemental a la atmósfera a cualquier temperatura. No es buen conductor del calor comparado con otros metales, aunque es un buen conductor de la electricidad. Se alea fácilmente con muchos otros metales no féreos, produciendo amalgamas con oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio. Es insoluble en agua y soluble en ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ).

En sus compuestos, el mercurio se encuentra en los estados de oxidación 0 (elemental), +1 (mercurioso) ò +2 (mercúrico). Estas formas pueden dar origen a un gran número de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, aunque la forma mercuriosa es raramente estable bajo condiciones ambientales convencionales (Adriano, 2001).

Algunas sales de mercurio:  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  o  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$  están disociadas, ya que son muy solubles en agua en condiciones ácidas oxidantes. A causa de la hidrólisis, las soluciones acuosas de estas sales reaccionan como ácidos fuertes. Puede haber compuestos en los que los átomos de mercurio están enlazados con átomos de carbono o de nitrógeno:  $\text{H}_3\text{C-Hg-CH}_3$  ó  $\text{H}_3\text{C-CO-NH-Hg-NH-CO-CH}_3$ . Sus isótopos y la abundancia relativa de éstos se detallan a continuación:  $^{196}\text{Hg}$  (0,15%),  $^{198}\text{Hg}$  (10,1%),  $^{199}\text{Hg}$  (16,4%),  $^{200}\text{Hg}$  (23,1%),  $^{201}\text{Hg}$  (13,2%),  $^{202}\text{Hg}$  (29,8%) y  $^{204}\text{Hg}$  (6,8%).

El mercurio se suele encontrar en la naturaleza como sulfuro: cinabrio o metacinabrio ( $\text{HgS}$ ). El cinabrio es el más común, y presenta con frecuencia un característico color "rojo de cinabrio"; el metacinabrio por su parte, es de color negro. También es frecuente que las mineralizaciones de mercurio contentan gotas pequeñas de mercurio metálico denominado "mercurio nativo". Otros minerales de mercurio que podemos encontrar en distintos ambientes son:  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{HgSO}_4$ ,  $\text{HgO}$ ,  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (calomel),  $\text{HgS}$  (cinabrio),  $\text{HgS}$  (metacinabrio),  $\text{Hg}_3\text{S}_2\text{Cl}_2$  (corderoita),  $\text{Hg}_2\text{NCl} \cdot 0.5(\text{SO}_4) \cdot 0.3(\text{MoO}_4) \cdot 0.1(\text{CO}_3) \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$  (mosesita),  $\text{Hg}_3(\text{SO}_4)\text{O}_2$  (schuetteita) y  $\text{Hg}_2\text{ClO}$  (terlinguaita).

El mercurio no puede mojar ninguna superficie con la cual entre en contacto debido a su alta tensión superficial, que es seis veces mayor que la del agua en contacto con el aire, es decir,  $484 \text{ dinas cm}^{-1}$ .

## 1.2. APLICACIONES DEL MERCURIO

Este elemento ha tenido una gran variedad de usos a lo largo de la historia; ha sido utilizado desde hace más de 4000 años por casi todas las culturas humanas. En Egipto se conocen monumentos funerarios de los años 1600-1500 a.C. que contenían mercurio; en la India se llegó a creer que el mercurio tenía propiedades afrodisíacas (Kaiser y Tolg, 1980), los fenicios lo utilizaban ya para la recuperación del oro, mientras que los romanos, griegos y árabes lo utilizaban con fines medicinales y cosméticos. El Bermellón (polvo de cinabrio mezclado con aceite de linaza, de color rojo anaranjado) era utilizado como pintura en la antigua China, antiguo Egipto y Roma. Los Incas también conocían el cinabrio y lo utilizaban como pintura, al igual que los mayas.

A lo largo de los años, el uso del mercurio se extendió en el campo de la medicina. En 1499 se comenzó a utilizar como tratamiento para la sífilis (Berman 1980) y como antiséptico para tratar otras muchas enfermedades (Goldwater, 1972). En particular sus propiedades antisépticas popularizaron su uso durante el siglo 20 en los compuestos comerciales denominados “mercurocromo” o “mercromina”.

En 1275 este elemento fue utilizado en el reloj de Alfonso X el Sabio. Pero el uso más importante comenzó a aplicarse en 1557 por el metalúrgico sevillano Bartolomé de Medina, desarrollando el método llamado “Beneficio del Patio” que servía para la amalgama en frío y beneficio de los minerales de plata (Castillo, 2001). Esta sería durante muchos años la base de la producción de mercurio en el distrito minero de Almadén (España) e Idria (Eslovenia): la producción y exportación del mercurio líquido a Sudamérica, para el beneficio de los minerales de plata de las áreas de San Luis Potosí (México) y de Potosí (Bolivia). En 1643, Torricelli lo usó en su barómetro; en 1720 Fahrenheit lo usó en su termómetro; y Priestley lo utilizó para el análisis de gases a finales del siglo XVIII, lo que supuso un importante incremento de la producción de este elemento, dada la popularización de las medidas de temperatura y presión barométrica.

Desde entonces, el mercurio ha tenido un gran número de aplicaciones; hay que destacar su uso en el proceso de separación electrolítica de cloro y sodio a partir de la sal común (NaCl), en la cual el mercurio se utiliza como cátodo de la celda electrolítica; esta corriente provoca la reacción química que descompone cloruro sódico (sal común). Este proceso produce gas cloro e hidróxido sódico (sosa cáustica), de los que se obtienen a su vez productos para potabilizar agua, fabricar detergentes, jabón, papel y plásticos. Podemos encontrar trazas de mercurio en su forma natural en el carbón, petróleo y en muchas rocas y suelos.

Sus usos industriales por especies se relacionan a continuación:

Como mercurio metálico: se utilizaba en la producción electrolítica de hidróxidos a partir de cloruros de sodio y potasio, fabricación y reparación de termómetros, barómetros y bombas de vacío; también se usaba para amalgamas dentales, en la minería de oro y plata, fabricación de lámparas de mercurio, tubos fluorescentes y lámparas modernas de bajo consumo y tubos de rayos X, como usos más extendidos.

Como mercurio orgánico: los compuestos alquílicos han sido usados en la agricultura como plaguicidas, fungicidas y para el tratamiento de simientes y granos; los compuestos



fenilmercúricos se usaron como antisépticos y en el tratamiento de granos y maderas, mientras que el mercurocromo se utiliza como antiséptico.

Como mercurio inorgánico: se ha empleado en pinturas protectoras y como tratamiento de la madera y papel; el óxido de mercurio se usaba para la fabricación de baterías secas de larga duración y como antiséptico; el fulminato de mercurio, en cartuchería; el mercurio amoniaco se empleaba como antiséptico y antipsoriásico; y el cloruro de mercurio, como conservante de tejidos y catalizadores químicos. El nitrato ácido de mercurio (mordiente de piel de conejo para convertirlo en fieltro, en la industria de la sombrerería) se empleó también para taxidermia y tratamientos especiales de pieles.

En la actualidad está considerado como un Contaminante Global, y por ello se ha prohibido en gran parte del mundo, debido a su toxicidad tanto por inhalación, ingestión o contacto dérmico, pero, sobre todo, por su facilidad para traspasar fronteras, debido a la movilidad ambiental de muchos de sus compuestos, en particular de los gaseosos. Debido su toxicidad, en el año 2013 se estableció el Convenio de Minamata, convenio que pretende ser mundial, el cual tiene como objetivo proteger la salud del ser humano y el medio ambiente de las emisiones antropogénicas del mercurio y de sus compuestos. Este Convenio incluye la prohibición de nuevas minas de mercurio, cese de producción de las existentes y unas medidas para controlar dichas emisiones y liberaciones del mercurio a lo largo del ciclo de vida.

Aunque ahora se conocen los graves efectos provocados en la salud debido a la exposición a los vapores de mercurio, antiguamente en China y Tíbet, el mercurio era recomendado para prolongar la vida; por ello el primer emperador de China murió por beber una mezcla de mercurio y jade (roca ornamental) en polvo, recetado por los alquimistas de la Dinastía Qin que pretendían darle vida eterna. Mientras que el segundo gobernante de Egipto construyó un recipiente de mercurio en el cual se tendía y balanceaba para dormir.

### **1.3. TOXICIDAD DEL MERCURIO**

La toxicidad del mercurio era conocida desde la antigüedad, por Hipócrates, Plinio y Galeno. El mercurio es uno de los metales con toxicidad más reconocida, existiendo compuestos tóxicos del elemento incluso a muy bajas concentraciones. Se puede afirmar que se trata de un metal tóxico, ya que no tiene un papel biológico específico; esto hace que no sea necesario para el organismo. A partir de ciertas dosis produce problemas en la salud, pero su toxicidad depende de las especies químicas en las que se presente en el medio, siendo el metilmercurio  $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$  y el dimetilmercurio  $((\text{CH}_3)_2\text{Hg})$  los compuestos más tóxicos. Su carácter volátil hace que se considere como un contaminante global, dispersándose con gran facilidad incluso hasta cientos de kilómetros desde la fuente que lo produce y acumulándose en diferentes compartimentos ambientales.

Los compuestos orgánicos son más tóxicos que los compuestos inorgánicos, debido a su mayor solubilidad en lípidos, lo que hace que aumente su potencial de absorción biológica y su bioconcentración.

La toxicidad puede afectar a exposiciones por vía respiratoria, digestiva ó cutánea. La adquisición por vía respiratoria se produce por inhalación: Esta vía es la más importante, ya que al ingresar por el sistema respiratorio puede alcanzar la sangre con una eficacia del 80%.

La adquisición por vía digestiva se produce por ingestión: en esta ruta de adquisición el mercurio metálico se absorbe en cantidades menores al 0,01 %, mientras que los compuestos inorgánicos (sales) se absorben entre el 2 y 15 %, aunque la absorción de los compuestos orgánicos es del 95 %. La adquisición por vía cutánea se produce mediante contacto directo. Esta vía no tiene tanta importancia como las anteriores en términos absolutos, por los pocos casos en los que se produce la intoxicación, aunque se han descrito casos de intoxicación por aplicación de compuestos que contenían metilmercurio. De hecho, el conocimiento del carácter tóxico del metilmercurio se acrecentó cuando Karen Wetterhahn, investigadora en rutas de exposición a metales tóxicos del Dartmouth College (USA), murió a causa de un accidente en el laboratorio cuando manipulaba un patrón puro de dimetilmercurio. Al parecer, el compuesto se había filtrado a través de los guantes que utilizaba, produciendo su muerte pasados seis meses de la exposición.

La acrodinia es conocida como una enfermedad en niños expuestos a vapor mercúrico. Sus síntomas son trastornos digestivos, coloración de las mejillas y nariz, decaimiento, apatía, edemas y retraso del desarrollo.

El hidrargirismo consiste en una serie de trastornos causados por la intoxicación de mercurio producida por la inhalación de vapores de mercurio. Se trata de la enfermedad que fue más común entre los trabajadores de la empresa Minas de Almadén (MAYASA). En concreto, según Sánchez-Martín (1924), a principios del Siglo 20 afectaba a un porcentaje muy alto de los trabajadores de la empresa. Con posterioridad, la empresa rebajó la exposición de los trabajadores a este agente gaseoso mediante la reducción de la jornada laboral de los trabajadores expuestos, que pasó a ser de 8 jornadas de 6 horas al mes. La sintomatología de esta enfermedad es la siguiente: el principal síntoma eran los temblores, los cuales se iniciaban en labios, lengua y dedos, produciendo náuseas, vómitos y diarrea, depresión, alteraciones del sistema nervioso, irritabilidad, tristeza, ansiedad, insomnio, temor, pérdida de memoria, debilidad muscular, sueño agitado y alteraciones renales.

Para la detección de intoxicación se realizan pruebas en muestras de biomarcadores como pelo, orina o sangre, con distintas periodicidades dependiendo del grado de exposición de cada grupo de trabajadores. El antídoto más adecuado es el dimercaprol (BAL) por vía intramuscular (Ferrer, 2003). En el caso de los trabajadores de MAYASA, en caso de detectarse “impregnación” (contenidos altos en sangre y orina), el trabajador pasaba a realizar temporalmente trabajos sin exposición al mercurio, en otros sectores de actividad de la empresa como la agricultura o ganadería (finca “Castilseras”), hasta que la “impregnación” descendía a niveles que se consideraban suficientemente bajos.

Por su parte, el denominado “síndrome de Minamata” es otra enfermedad grave producida por el mercurio, y que fue causado por la ingestión de metilmercurio, en la bahía de Minamata (Japón, años 1950-1960s); este accidente consistió en el envenenamiento de los pescadores de la bahía y sus familias por el metilmercurio bioacumulado en el pescado, resultado del vertido a la bahía de Minamata de una planta química de plásticos (Chisso Corporation) que producía el metilmercurio como subproducto no deseado y lo vertía de forma directa a la bahía (Maruyama, 1996).

En Iraq, en los años 1940-1950s se produjo otro envenenamiento por ingestión de compuestos orgánicos de mercurio, debido al desvío a consumo humano, para obtención de pan, de grano tratado con fungicidas a base de compuestos orgánicos de mercurio (Skerfvin et al., 1976). Además de la afección del mercurio, también se estudia su toxicidad en los seres humanos en el medio acuático y terrestre. También la cuenca amazónica se ha visto afectada por los efectos contaminantes del mercurio. Se han podido encontrar concentraciones elevadas de mercurio en especies de peces piscívoros y carnívoros, en los que alrededor del 72 % superaban los niveles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Maurice-Bourgoin, 2001). Las comunidades indígenas también se han visto afectadas por este metal, ya que se alimentaban diariamente de los peces, observándose concentraciones de mercurio en los niños más jóvenes y detectándose anomalías en el desarrollo psicomotor de niños (Bourgoin, 2001). Esta contaminación puede deberse a las explotaciones auríferas, cada vez más numerosas en la Amazonía. Por otra parte, la presencia de mercurio en los materiales sedimentarios auríferos explotados en esta área se podría relacionar también con procesos naturales: el mismo proceso que ha acumulado oro en estos sedimentos puede haber aportado también mercurio. En cualquier caso, la población de regiones donde se lleva a cabo la minería del oro se ha visto afectada por la inhalación de vapores de mercurio, unido a la ingesta de peces contaminados y al consumo de agua contaminada, lo cual afecta a la salud de las personas expuestas a estas acciones. En los estudios que se realizaron (Díaz-Arriaga, 2014) se observó que existen bajos niveles de mercurio en las aguas superficiales, debido a que el mercurio es consumido por microorganismos acuáticos, encontrándose que en algunas circunstancias, se llegan a superar los  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , cuyo valor está estipulado en la legislación colombiana para fuentes hídricas destinadas a consumo humano, Además, estos mismos autores también han observado valores superiores a  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  en las aguas superficiales de algunos municipios colombianos, mientras que en otras zonas del mundo se han llegado a estipular valores por encima de  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Son todos ellos valores que superan el valor de referencia para aguas potables de la Organización Mundial de la Salud de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO, 1989), y que suponen un riesgo cierto para los habitantes de estas zonas. De nuevo habría que preguntarse hasta qué punto estas concentraciones están relacionadas con el mercurio líquido que emplean los “pequeños mineros” locales (el mercurio líquido, metálico, tiene una solubilidad en agua prácticamente nula, como se indica en el **Apartado 1** de esta Tesis), o de mercurio presente en los sedimentos a través de otros procesos naturales, que puede tener una tipología más variada y, por tanto, una mayor posibilidad de presencia de compuestos de solubilidad mayor.

#### **1.4. EFECTOS AMBIENTALES DEL MERCURIO**

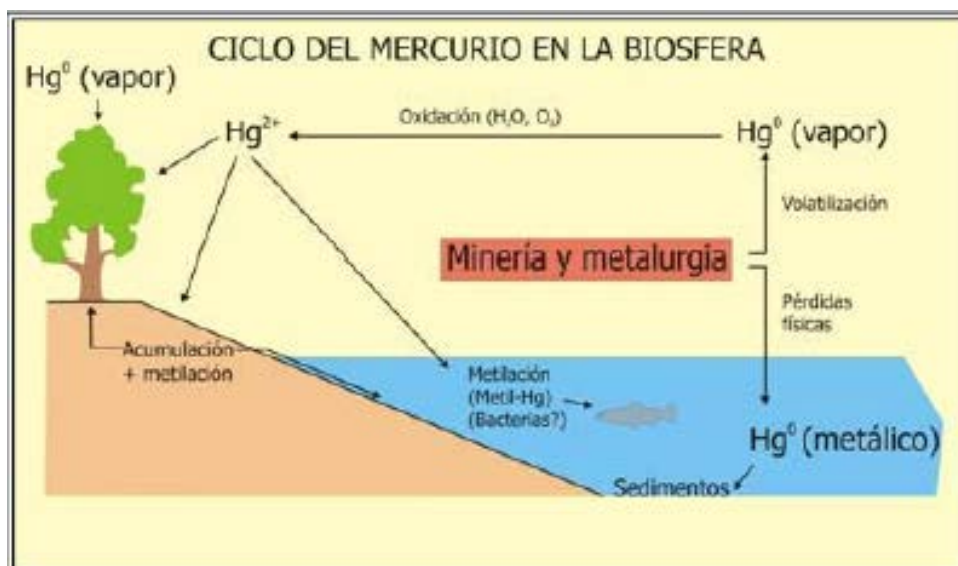
El mercurio inicia su ciclo biogeoquímico siendo emitido por las fuentes naturales (volcanes, yacimientos minerales, etc.) o antropogénicas (centrales térmicas de combustión, plantas clorocáusticas, minas de mercurio o de otros sulfuros en los que el cinabrio puede ser un mineral minoritario, etc.) al aire, suelo o masas de agua, de los que se puede transferir a las plantas, animales y al ser humano. Existen unos procesos continuos de emisión, deposición y transferencia entre compartimentos ambientales que favorecen la dispersión de este metal y su transformación en compuestos orgánicos, fundamentalmente en las grandes masas de agua, sobre todo en los océanos (Gray et al., 2003).

El medio ambiente en general, y el ser humano en particular, han vivido siempre en un entorno que ha contenido mercurio; a medida que han pasado los años y con el inicio de la era industrial, la concentración atmosférica de mercurio ha ido aumentando debido a la cantidad de mercurio existente en vertederos, desechos de la minería y sedimentos industriales contaminados, así como debido a su uso en actividades industriales que aumentaban las tasas de emisión a la atmósfera.

El mayor efecto negativo de la contaminación ambiental relacionada con el mercurio se produce en el medio acuático, debido a que este elemento en su forma orgánica constituye un tóxico fácil de adquirir para el pescado, en su forma más tóxica (metilmercurio), acumulándose en la biota acuática en concentraciones crecientes (bioconcentración) y niveles muy elevados a medida que va pasando el tiempo (bioacumulación), así como en los escalones sucesivos de la cadena trófica del medio (biomagnificación). De esta forma, los grandes predadores, y sobre todo el hombre, acumulan el metal, que produce los efectos tóxicos ya descritos en el apartado “Toxicidad del mercurio”.

Las aguas superficiales ácidas (con pH superior a cinco) pueden llegar a tener cantidades importantes de mercurio. Cuando los valores de pH están entre cinco y siete, las concentraciones de mercurio en el agua aumentan debido a la movilización del mercurio del suelo. Los microorganismos pueden convertir este mercurio en metilmercurio, el cual puede ser absorbido por organismos, ingresando en la cadena trófica de los organismos superiores.

El ciclo del mercurio en la biosfera puede resumirse como se observa en la figura 1. En la superficie terrestre, el mercurio metálico que se acumula en el suelo entra en varias rutas posibles de movilización: por su parte, el mercurio metálico tiende fundamentalmente a emitirse a la atmósfera; pero también en parte puede entrar en otros ciclos biogeoquímicos, que lo pueden transformar en compuestos iónicos; de hecho, en los estudios de especiación térmica (pirolítica) de este elemento realizados en medios en los que esta especie debería ser la más abundante, es muy difícil encontrar mercurio elemental, mientras que la especie dominante distinta al cinabrio es la denominada “mercurio ligado ácidos húmicos y fúlvicos”, que en realidad debe corresponder a mercurio iónico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) que queda retenido en la fracción orgánica del suelo, probablemente en relación con grupos sulfidrilo u otros con afinidad por este elemento. Con ello se forman compuestos aún no bien conocidos en el detalle, pero que suponen la posibilidad de que algunos sean más o menos solubles, entrando en el ciclo acuático, y algunos se incorporen con cierta facilidad a las plantas, entrando en el ciclo biótico vegetal. Más tarde en esta Tesis veremos que esta posibilidad es menos realista de lo que puede parecer en términos generales.



**Figura 1:** Ciclo del mercurio en la biosfera y fenómenos de especiación ( $\text{Hg}^0 \leftrightarrow \text{CH}_3\text{Hg} \leftrightarrow \text{Hg}^{2+}$ ).

Fuente: ([http://www.aulados.net/Temas\\_ambientales/Real\\_Decreto\\_Almaden/Almaden\\_contaminacion.htm](http://www.aulados.net/Temas_ambientales/Real_Decreto_Almaden/Almaden_contaminacion.htm))

### 1.5. MERCURIO EN SUELOS

Los niveles normales de concentración de este elemento en suelos, en áreas no impactadas por mercurio, alcanzan un valor de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Adriano, 2001), es decir, de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ , unidades más usadas en la presente memoria. Este metal suele concentrarse en rocas sedimentarias, sedimentos argílicos y, en particular en esquistos ricos en material orgánica.

Debido a que el mercurio tiene una alta afinidad para formar enlaces con carbono y azufre, su acumulación en el suelo suele mostrar una relación directa con la materia orgánica. El mercurio se emite en diferentes formas a partir de distintas fuentes; su distribución geográfica está controlada por parámetros intrínsecos y extrínsecos:

Los parámetros intrínsecos dependen de la forma del mercurio:

El mercurio gaseoso incluye tres especies clásicas, como son el mercurio gaseoso elemental (MGE), mercurio gaseoso reactivo (MGR) y mercurio particulado (MP). Estas formas gaseosas son emitidas a la atmósfera a través de ciertas fuentes, volviendo a los suelos mediante deposición húmeda o mediante deposición seca. La dinámica atmosférica implica ciertas posibilidades de cambio entre estas especies: el MGE puede oxidarse, mediante reacciones mediadas por el ozono y/o otros agentes oxidantes atmosféricos (compuestos halogenados, donde encontramos flúor y cloro, emitidos principalmente por las industrias de la cerámica, aluminio y vidrio, teniendo efectos negativos sobre la capa de ozono) pasando a MGR, mientras que la absorción de MGE o MGR por partículas de polvo en suspensión en la atmósfera incrementan la proporción de MP.

El mercurio iónico disuelto es liberado directamente al medio ambiente por determinadas industrias. La dispersión del mercurio se canaliza por cursos de agua, donde puede quedar retenido en los sedimentos o viajar en disolución o asociado a partículas, en función de las características concretas del medio acuático. También los procesos naturales antes descritos

en el apartado “Aplicaciones del mercurio” pueden inducir la dispersión de mercurio disuelto en el medio.

El cinabrio (mercurio sólido) es emitido a partir de fuentes de minería, como también pueden ser emitidos los sulfuros, sulfatos, cloruros y otros. Las partículas que se acumulan en escombreras, por ejemplo, pueden ser arrastradas y diseminadas por el viento y por los cursos fluviales hasta distancias muy variables.

Los parámetros extrínsecos son los siguientes:

El volumen influye en la extensión geográfica de la zona contaminada; por lo tanto, existe una gran importancia volumétrica del área de origen, teniendo en cuenta la cantidad de contaminantes, que se suelen reflejar en las concentraciones de mercurio en el suelo, pero también en la extensión del área en la que encuentra en tales concentraciones.

Los factores meteorológicos y climáticos, en particular el viento, afectan a la dirección y alcance de dispersión de la contaminación. La temperatura y radiación solar promueven emisiones de mercurio gaseoso de suelos contaminados (Llanos et al., 2011; Carmona et al., 2013).

La morfología topográfica del área fuente puede tener también una influencia en la distribución de los contaminantes emitidos desde un punto o área concreta.

En Europa existe un gran número de suelos donde podemos encontrar concentraciones relativamente altas de mercurio (FOREGS, 2005). En España las áreas más importantes, que tienen una mayor concentración de Hg son: Almadén (valores mayores de 0,5 hasta 260 mg kg<sup>-1</sup>) (Lindberg, 1979), Asturias, área de Usagre (Badajoz) y la zona de las Alpujarras (Granada-Almería) (IGME, 2012).

Hubo otras zonas analizadas en estudios diversos, y se encontró mercurio junto con otros metales pesados en suelos agrícolas de la cuenca del río Ebro y en suelos de tipo calcáreo almerienses y de la provincia de Valencia (Rodríguez-Martín et al., 2006; Gil et al., 2010).

La zona más afectada desde el punto de vista medioambiental, además de haber arrojado la mayor producción de mercurio en España, es el distrito de Almadén, particularmente en el recinto metalúrgico de Almadenejos. Esta situación fue estudiada por Martínez-Coronado et al. (2011) y Millán et al. (2011), llegando a la conclusión de que en esta zona se han llegado a alcanzar concentraciones de 40.000 mg kg<sup>-1</sup>, que corresponde a 0,4 % de Hg en los suelos.

Otros estudios, que han sido llevados a cabo por Llanos (2011), aseguran que, en el recinto metalúrgico de la Huerta del Rey, situado inmediatamente al norte de Almadén, se alcanzan concentraciones de 80-3,510 mg kg<sup>-1</sup> y en el área de la mina de Las Cuevas las concentraciones son de 6-4,153 mg kg<sup>-1</sup>.

Asturias representa otra de las zonas más afectadas por la presencia de Hg, aunque en menor medida que Almadén. Las concentraciones de mercurio promedio tienen lugar en sitios abandonados y se encuentran entre 80 y 300 veces más altas que la media de contenido de

mercurio en los suelos del mundo (Alloway, 1995) y hasta 37 veces mayores que los niveles de fondo locales (Ordoñez et al., 2013).

La zona del Valle de Azogue, entre las provincias de Murcia y Almería, corresponde también a antiguas minas de cinabrio que fueron abandonadas a mediados del siglo 20. Las actividades que aquí se realizaron han dejado un gran número de instalaciones mineras y metalúrgicas abandonadas, entre las que se incluyen vertederos, escombreras de calcinados y presas (Viladevall et al., 1999; Navarro et al., 2006, 2009; Navarro, 2008).

#### **1.6. MERCURIO EN PLANTAS**

El crecimiento de las plantas depende de un ciclo de nutrientes esenciales, que sería, en esencia, y en teoría al menos, el siguiente: las plantas actúan sobre el suelo como vía de captación y absorción del mercurio que se pueda encontrar en forma biodisponible en el suelo (Millhollen et al., 2006a). Algunos metales pesados como el cromo, mercurio y plomo son tóxicos para las plantas, incluso en concentraciones bajas (Mendelssohn et al., 2001; Zhang et al., 2001; Shaw et al., 2004; Burzynsky y Zurek, 2007) alterando los procesos fisiológicos de la planta y teniendo un efecto negativo en su crecimiento y desarrollo.

La raíz es el órgano responsable de asimilar los nutrientes del medio, por lo tanto, los efectos de los metales en las plantas empiezan en la raíz, y estos afectan al resto de la planta.

Al producirse daños en las hojas, es decir, en cloroplastos y mitocondrias, se alteran los procesos de fotosíntesis y de respiración.

Existen algunos organismos, como los briófitos y líquenes, que no presentan raíces, sino que toman directamente los metales desde el agua o el aire; por esta razón, algunas de estas especies pueden bioconcentrar altos niveles de mercurio dependiendo del tipo de suelo, ya que el mercurio suele unirse a la materia orgánica y disminuir la absorción (WHO, 1989; López Berdonces, 2016; López Berdonces et al., 2017).

Los musgos pueden llegar a acumular gran cantidad de metilmercurio (Qiu et al., 2006; Li et al., 2008), debido a que existe una relación entre la concentración de mercurio en el aire y su acumulación por parte de ellos mismos (Qiu et al., 2005; Miteva et al., 2018).

En hayas y abetos la absorción de mercurio a través de sus hojas sería insignificante; lo contrario sucede con los pinos y plantas herbáceas (Qiu et al., 2006; Millhollen et al., 2006a; Millhollen et al., 2006b). En los estudios que se han realizado sobre especies de herbáceas, se ha llegado a la conclusión de que en lugares donde existe una mayor concentración de CO<sub>2</sub>, y altas concentraciones de mercurio, la concentración de mercurio en especies herbáceas es baja. Sin embargo, las concentraciones de mercurio en el aire tienen una mayor influencia que las concentraciones en el suelo, ya que la planta acumula más en las hojas que en las raíces (WHO, 1989, Molina et al., 2006),

Las plantas acuáticas absorben el mercurio que se encuentra acumulado en los sedimentos a través de las raíces; lo contrario sucede en otras plantas, ya que lo absorben por la hoja y follaje, teniendo una gran capacidad para acumular grandes cantidades de mercurio y metilmercurio (Wang et al., 2009).

Según los estudios realizados por Lucena et al. (1993); Millán et al. (2006) y Malikova (1999), la cantidad de mercurio acumulado en las plantas es mayor cuanto mayor es la concentración de mercurio en el suelo.

La absorción de mercurio en las plantas desde el suelo dependería de varios factores que afectan tanto a las propiedades de las plantas como de los suelos. En algunas de las investigaciones realizadas por Beauford et al. (1977), Boening (2000) y Patra y Sharma (2000), se observaron efectos debidos a las altas concentraciones de mercurio, como son las inactivaciones de procesos metabólicos que dan lugar a inhibiciones significativas en el crecimiento de las plantas, absorción de agua, reducción de la talla de la planta, de la longitud de la raíz, área de las hojas o incluso en el número de las semillas que germinan en buenas condiciones. Además, también se ha observado la reducción de materia seca total de las plantas y el contenido en clorofilas en algunas ocasiones, incluso se han incrementado daños visibles en las hojas, viéndose un declive en el contenido de pigmento en las mismas.

### **1.7. VEGETALES COMESTIBLES**

Los vegetales aportan vitaminas, hierro, carbohidratos, calcio y otros nutrientes en la alimentación animal. Pero, por otra parte, pueden absorber metales pesados, como el mercurio, del suelo, acumulándose en varias partes de la planta (Qiu et al., 2006; Millhowen et al., 2006a; Rothenberg et al., 2007). De esta forma, la agricultura puede verse afectada por la acumulación de metales pesados existentes en el suelo (Ejaz-ul et al., 2007).

Existen numerosos estudios que demuestran la relación de contaminación con mercurio a nivel ambiental y su acumulación en los vegetales comestibles; un ejemplo claro es el maíz: éste acumula altas cantidades de mercurio en cualquier parte de la planta (Qiu et al., 2006; Rothenberg et al., 2007; Zheng et al., 2007), al igual que el arroz (Li et al., 2009; Qiu et al., 2006; WHO, 1989; Horvat et al., 2003) y las coles verdes (Qiu et al., 2006). Egler et al. (2006) describen altas concentraciones del elemento en algunos frutos como papaya, mango, limón, maracuyá, y en partes verdes de la planta de especies como tomate, lechuga y yuca, según estudios realizados en Brasil. Por su parte, Sierra (2008) analizó plantas criadas en macetas y en invernadero (veza, cantueso y berenjena), donde se muestra que los valores de mercurio fácilmente disponible en el suelo son muy bajos, observando que, a lo largo del tiempo, el mercurio total y el disponible se mantienen en equilibrio.

Göthberg y Greger (2006) y Greger y Dabrowska (2010) mencionan la posibilidad de intoxicación de la población humana debido a la presencia de metilmercurio en las espinacas de agua (*Ipomoea aquatica*), que son plantas tropicales cultivadas y consumidas como verdura.

Por su parte, Martínez-Coronado et al. (2011) obtienen datos relevantes sobre la planta comestible silvestre *Asparagus Acutifolius* (espárrago común comestible) dentro del recinto metalúrgico de Almadenejos, concretamente en la zona en la que se detectaron mayores concentraciones de metilmercurio en el suelo (Gray et al., 2004), obteniendo unos valores de hasta 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  en la parte aérea y 443  $\mu\text{g g}^{-1}$  en raíces. Cierta transferencia al cabello humano con acumulación en éste podría estar relacionado con las verduras y alimentos derivados de los animales que han crecido en sitios altamente contaminados de mercurio (Diez et al., 2011; Higuera et al., 2015).



### 1.8. DISTRITO MINERO DE ALMADÉN

Almadén (Figura 2), municipio español de la provincia de Ciudad Real, Comunidad Autónoma de Castilla-La-Mancha, y situado a 4º 49'O y 38º 46'N, es la localidad de referencia del mayor distrito minero de mercurio del mundo, extendiéndose sobre un área de unos 300 km<sup>2</sup> (Hernández et al., 1999).

En cuanto a su población, Almadén ha ido decreciendo a lo largo de los años. En 1950 llegó a tener 12.357 habitantes, teniendo en cuenta que según el último censo de 2016 hay 5.657 habitantes, de los cuales pocos son habitantes jóvenes (INE 2016).

Se encuentra en la Comarca del Valle de Alcudia, siendo la capital de esta. El resto de las localidades de la Comarca incluye a Guadalmez, Gargantiel, Valdemanco del Esteras, Saceruela, Chillón, Alamillo, Agudo y Almadenejos.

Desde el punto de vista climatológico, la zona se caracteriza por tener un clima Mediterráneo, con inviernos húmedos y fríos, oscilando sus temperaturas promedio entre 6°C y 8°C, teniendo en cuenta que la temperatura extrema llega a -2°C, mientras que los veranos son secos y cálidos, llegando a una temperatura máxima de 40°C. La media anual de temperatura es de 16°C y la de precipitación es de 587 mm (Carrasco et al., 2001). Su balance hídrico muestra un exceso de agua en invierno y falta de lluvia en los meses de verano. Las reservas de agua en el suelo disminuyen en verano y el suelo permanece seco durante las lluvias otoñales, debido a que la media anual de potencial de evapotranspiración es de 963 mm; esto quiere decir que existe un régimen de humedad xérico (Soil Survey Staff, 1999). Con respecto a la pluviometría, las precipitaciones son irregulares, moderadas durante todo el año, salvo en los meses desde junio a agosto que suele existir sequía.



**Figura 2:** Situación geográfica de Almadén.

Fuente: <http://www.dealmaden.com/datos.htm>

Desde el punto de vista fisiográfico, cuenta con valles estrechos y montañas, con un relieve de tipo Apalachense, variando de altitud entre 200 y 1000 metros sobre el nivel del mar.

Almadén se encuentra en una de las comarcas naturales más singulares de nuestra geografía, contando con una importante riqueza ecológica y paisajística, donde la vegetación es fundamentalmente silicícola. Su paisaje vegetal se compone de alcornoques y encinas,

destacando las escasas pendientes de terreno, que hacen que los encinares sean usados para ganado ovino y bovino en las denominadas Dehesas, características del Oeste de España central.

Estos ecosistemas mediterráneos de tipo dehesa tienen rasgos bióticos y climáticos peculiares, debido a que su estructura y funcionamiento está ligada a la actividad humana sobre los procesos naturales (Blondel et al, 1999).

En cuanto a su composición florística, podemos encontrar lentisco (*Pistacia lentiscus* L.), majuelo (*Crataegus monogyna* J.), madroño (*Arbutus unedo* L.), arce (acer), cornicabra (*Pistacia terebinthus* L.) y coscoja (*Quercus coccifera* L.), mientras que en el estrato herbáceo encontramos: rubia (*Rubia tinctorum* L.), orquídeas (Orchidaceae), gramíneas (Poaceae) y helechos (Tracheophyta) (Ver figura 3).

Debido a su situación geográfica, es una comarca privilegiada en cuanto a orden faunístico como cinegético. Cabe destacar animales como venado (*Odocoileus virginianus*), perdiz (*Nothoprocta pentlandii*), gineta (*Genetta genetta*), y cigüeña negra (*Ciconia nigra*).



**Figura 3:** Flora del Distrito minero de Almadén.

Fuente: <http://www.comarcadealmaden.com/flora/>

Debido a la intervención del ser humano, surgieron las dehesas, palabra proveniente de la raíz latina “deffesa”, que alude a su carácter original de finca cerrada y cercada, considerado este tipo de terrenos para el descanso y alimentación del ganado doméstico o en cualquier caso para su labor (figura 4). Esta intervención del ser humano fue sobre determinados bosques mediterráneos en los que el aprovechamiento agrícola, ganadero y forestal ha constituido un mosaico de vegetación de formaciones arboladas abiertas. El resultado es que este tipo de

elemento agrícola, la dehesa, constituye el tipo de paisaje propio de la zona, con arbolado de encinas y suelos libres para el crecimiento del pasto que requiere el ganado.



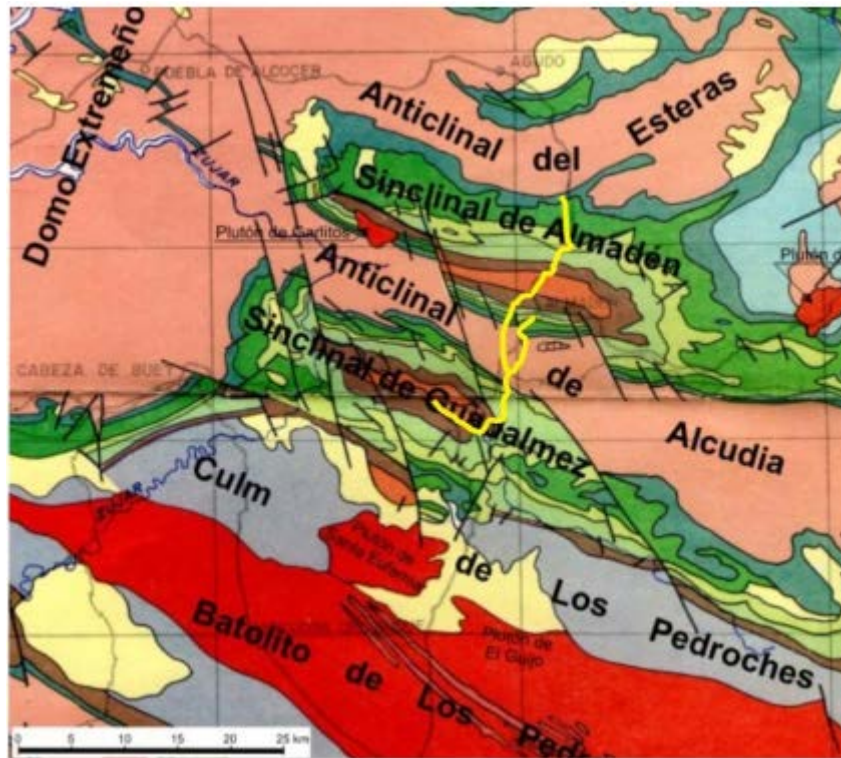
**Figura 4:** Dehesa de Castilseras.

Fuente: <http://www.almaden.es/turismo/dehesa-de-castilseras.html>

Desde el punto de vista geológico, el distrito Almadén se sitúa en la parte meridional de la Zona Centroibérica, subdivisión del Macizo Ibérico (Gallardo et al., 2012); su litología está compuesta por rocas detríticas y volcánicas que van desde el Proterozoico superior hasta el Carbonífero (figura 5).

Este distrito es de gran interés geológico a nivel mundial, debido tanto a que es el único del mundo con más de 2000 años de actividad extractiva de un elemento como es el mercurio, así como por el enorme volumen de este elemento que ha sido extraído mediante la actividad minera.

La estructura tectónica de este sector de la Zona Centroibérica (figura 5) muestra la presencia de grandes pliegues, entre los que destaca el Sinclinal de Almadén, con dirección ONO-ESE, cuyas dimensiones son de 25 km de largo por 10 de ancho, con el flanco sur verticalizado y el norte más tendido. El distrito minero se localiza en coincidencia con la máxima extensión en sentido N-S de esta estructura.



**Figura 5:** Esquema geológico de la región de Almadén.

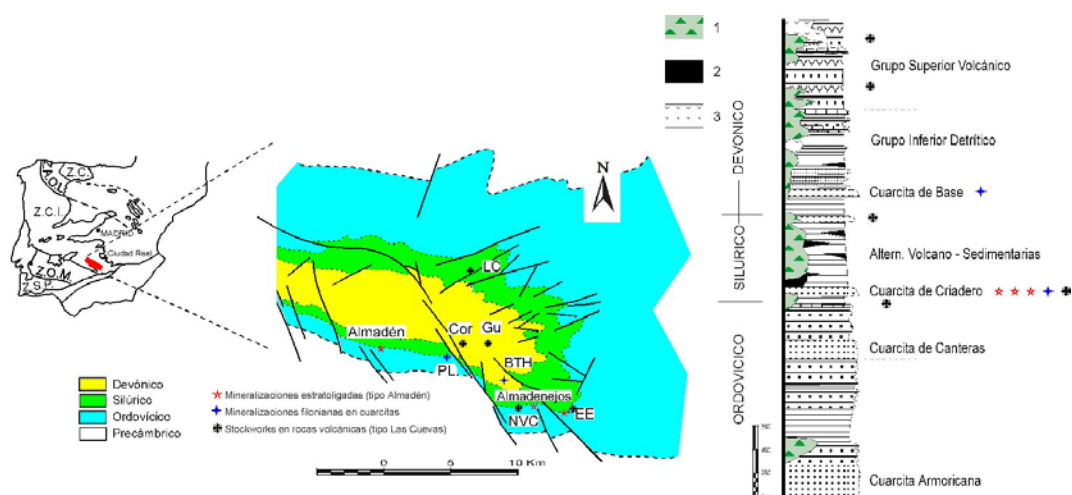
Fuente: [http://www.sociedadgeologica.es/archivos\\_pdf/g12triptico\\_creal.pdf](http://www.sociedadgeologica.es/archivos_pdf/g12triptico_creal.pdf)

En cuanto a la litología (figura 6), cabe destacar tres grupos principales de materiales (Higuera et al., 2000):

**Precámbricos:** cuenta con la existencia de materiales grauváquicos y pelíticos, además de conglomerados, calizas, dolomías arenosas y brechas intraformacionales.

**Paleozoicos:** incluyen pizarras, areniscas y cuarcitas, con algo de calizas. Suelen aparecer materiales volcánicos de carácter máfico a intermedio.

**Pliocuaternarios:** formados por rañas (fanglomerados con cantos cuarcíticos, con matriz limosa, redondeados y tonos rojizos), aluviales (son depósitos fluviales que tienen poco espesor, están constituidos por cantos y gravas redondeadas con la matriz arenosa).



**Figura 6:** Situación geológica y estratigráfica del distrito de Almadén.

Fuente: <http://www.uclm.es/users/higueras/tema/almaden/sincl3.jpg>

Este distrito de Almadén ha producido un tercio de todo el mercurio producido por minería en los últimos 2000 años (Saupé, 1990; Hernández et al., 1999); a su vez, más del 95% de la producción minera del distrito procede de la mina de Almadén, mientras que el resto de los yacimientos ha proporcionado producciones mucho menores.

Debido al gran tamaño del distrito, y como consecuencia de los siglos de explotación minera e industria minero-metalúrgica, Almadén es reconocido como uno de los lugares más afectados del mundo por el mercurio (Higueras et al., 2006), que se ha traducido inevitablemente en una importante diseminación medioambiental del elemento.

Las tres minas más importantes dentro del distrito de Almadén son: Almadén, El Entredicho (a cielo abierto) y Las Cuevas, donde se han encontrado valores muy elevados de mercurio en suelos y plantas en sus proximidades (Millán et al., 2003; Millán et al., 2004). A cierta distancia en cuanto a producción se refiere, y en cuanto a extensión de su historia minera, también hay que señalar las minas de La Nueva y La Vieja Concepción, ambas en Almadenejos, así como hasta un total de más de 60 puntos donde se localizan pequeñas o medianas labores de investigación o presencia de cinabrio (Puche, 1989).

En cuanto a los suelos del distrito minero de Almadén, corresponden mayoritariamente a entisoles, inceptisoles y alfisoles, localizando una zona de antrosoles según la clasificación de Soil Survey Staff (1999). Como elemento característico de la zona, estos suelos contienen concentraciones de mercurio muy variables, debido a distintos mecanismos, tanto naturales como antrópicos, encontrando concentraciones por encima de los  $1700 \text{ mg kg}^{-1}$  en zonas con influencia antropogénica y valores alrededor de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  en el caso de sistemas naturales (Millán et al, 2007):

La presencia de mercurio en los suelos de forma natural proviene de la existencia de yacimientos de cinabrio, ya que a partir de estos yacimientos se produce dispersión del elemento, debido tanto a las aureolas de dispersión primarias, originadas en relación con la génesis del yacimiento, como a las aureolas de dispersión secundarias, debidas a la interacción de los componentes del yacimiento con las aguas subterráneas y a su dinámica.



Debido a la actividad minera, la cual potencia su dispersión, al extraer los minerales y someterlos durante extensos periodos de tiempo a la acción de la atmósfera.

La acumulación de vapor de mercurio atmosférico hallados en los suelos se puede producir por tres mecanismos: depósito de partículas de cinabrio o que contengan mercurio en diversas formas; depósito del propio vapor de mercurio en estado metálico; o depósito de mercurio en forma iónica, debido al efecto oxidante de la atmósfera sobre el vapor.

En el caso concreto del distrito de Almadén, se dan las tres posibilidades de origen del mercurio en suelos: en algunas zonas se observan altos contenidos en suelos, donde no ha existido actividad minera ni metalúrgica; por lo tanto, se observa la relación con mineralizaciones de pequeña importancia; por otro lado, existen zonas con altos contenidos de mercurio debido sin lugar a dudas a actividad minera y/o metalúrgica, como es el caso del recinto metalúrgico de Almadenejos; también en algunos puntos se ha detectado la presencia de mercurio en suelos, junto con restos de piezas de cerámica, que se ha podido relacionar con la existencia de labores metalúrgicas a pequeña escala (García-Donas, 2016).

En algunos suelos estudiados se observa que el contenido de mercurio es muy variable y alcanza valores de hasta el 1% (Higueras et al., 2003).

Al describir la mineralogía del suelo (Higueras, et al., 2004) se puede observar que incluye especies poco reactivas, las cuales no contribuyen a la retención del elemento: illita, pirofillita, clorita y cuarzo; estos componentes son los más comunes, junto con los carbonatos, que aparecen mucho más irregularmente distribuidos.

En cuanto a las aguas del distrito, vemos que el principal problema que representa el mercurio es que pueda ser transformado en metilmercurio, ya que éste, en el medio acuático, se incorpora fácilmente a los seres vivos que viven en él: los peces captan el elemento a través de sus agallas, pasan a su sistema circulatorio, bioacumulándose en sus órganos y masa muscular, por lo tanto, el mercurio se incorpora a la cadena trófica del ser humano a través de la pesca.

Al analizar contenido de mercurio y metilmercurio en las aguas de algunos arroyos del entorno de Almadén y río Valdezogues, Gray et al. (2003) observan que los contenidos en las aguas no son preocupantes para la salud del ser humano, aunque sí para los peces, al superar el límite de transferencia a la cadena trófica.

Al considerar la problemática del mercurio en aire, hablamos de que existen tres focos de emisión potenciales:

Actividad metalúrgica: esta actividad es el principal foco de contaminación, afectando directamente al casco urbano de Almadén, donde los valores obtenidos superan el límite recomendado por la OMS, especialmente en las épocas en las que existen altas temperaturas; por lo tanto, Almadén es la zona sometida al máximo riesgo ambiental en este sentido (Tejero et al., 2015).

Emisión por suelos contaminados (Llanos et al., 2011).

Emisión por parte de áreas de labores mineras y sus escombreras (Higueras et al., 2006).

### 1.9. ALMADENEJOS

Almadenejos, población minera, situada en la provincia de Ciudad Real, en la comunidad autónoma de Castilla- La Mancha (figura 7). Se encuentra al suroeste del Valle de Alcudia, a unos 13 km. al Este de Almadén, contando con 460 habitantes según el censo de 2016 (INE, 2016). Esta población se sitúa en la ruta de la calzada romana que unía Fontanosas con Chillón.

El clima característico de Almadenejos es, al igual que el de Almadén, de tipo mediterráneo, caracterizado por su continentalidad, teniendo veranos muy cálidos e inviernos suaves, alcanzando temperaturas máximas en julio y agosto (44°C), mientras que las temperaturas mínimas se alcanzan entre diciembre y enero (6°C).

Desde el punto de vista geológico, el término de Almadenejos, como el de Almadén, está formado por estructuras y formaciones del Orógeno Varisco en el Macizo Ibérico.

Dentro del término municipal de Almadenejos encontramos diversas minas y yacimientos menores de mercurio; los más conocidos son las minas de La Nueva y La Vieja Concepción, ambas subterráneas, y activas con anterioridad al siglo XX; y la mina a cielo abierto de El Entredicho, activa entre 1983 y 1997. Además, aparecen contenidos de mercurio impregnando diversas formaciones cuarcíticas, como por ejemplo la denominada “Cuarcita de Base del Devónico”, en el área denominada “El Burcio-Las Tres Hermanas” (Hernández et al., 1999). Las mineralizaciones consisten en rellenos de cinabrio y alguna ganga (carbonatos, barita) de fracturas y filones, o reemplazamientos parciales de las rocas encajantes, en particular de las de naturaleza volcánica.

El origen de la localidad se debe al descubrimiento y explotación del yacimiento conocido como la mina de la Concepción Vieja a finales del siglo XVII. Este yacimiento es el peor conocido de los de importancia del distrito, con una producción de unos 100.000 frascos; comenzó su explotación en 1701, cerrándose en 1800 debido al agotamiento de sus reservas (Almansa, 2012).

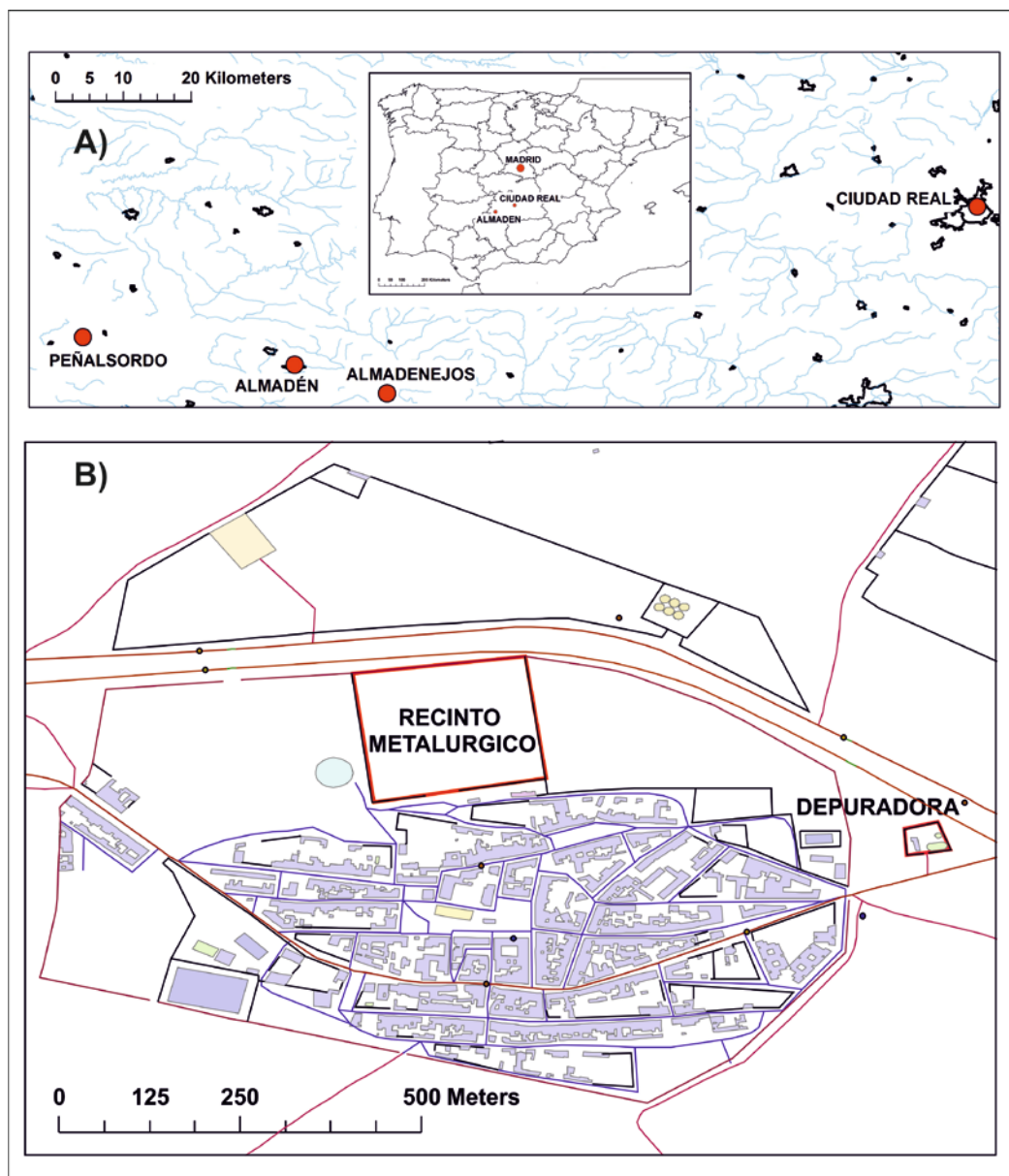
Más tarde, entre los años 1774 y 1775, se descubrieron las minas de El Entredicho y de Valdeazogues, situadas al sudeste de Almadenejos; actualmente ambas minas se conocen como El Entredicho. Gracias a la explotación de estos yacimientos, tras el cierre de la Vieja Concepción, se evitó el traslado de los trabajadores a Almadén y la ruina de los edificios construidos en Almadenejos (hospital, cerco de buitrones, etc.).

En 1779 se descubrieron indicios de mineralización en la Dehesa de Castilseras, dando lugar a la explotación de un nuevo yacimiento, llamado inicialmente mina de Gilobrero y posteriormente La Nueva Concepción, empezando a trabajar en ella a partir de 1780 hasta mediados del siglo XIX. Esta mina representa un ejemplo importante de explotación de mercurio del distrito minero de Almadén, debido a su alto volumen de reservas, fue considerada el tercer yacimiento del Distrito, ya que obtuvo una producción de unos 180.000 frascos desde 1795 hasta 1945.

La Vieja Concepción fue abandonada en 1800 debido a su excesiva profundidad y sus escasos contenidos en mercurio en sus niveles más profundos. Almadenejos perteneció al término municipal de Almadén hasta 1836, por lo tanto, estas minas siempre estuvieron bajo la

dirección del Establecimiento Minero de Almadén. Dentro de esta población, también podemos encontrar la parcela conocida como “Cerco de Buitrones” (denominado en varios de los estudios recientes como “Cerco Metalúrgico de Almadenejos”), donde se encuentra un sistema de hornos en los que se extraía el mercurio a partir del cinabrio de los yacimientos próximos. Tiene una extensión de aproximadamente 3,29 hectáreas, donde se concentran unos niveles muy altos de mercurio en suelo (Gray et al., 2004; Millán et al, 2007; Martínez Coronado et al., 2011; Campos et al., 2018).

En esta zona se estuvo trabajando desde la época romana hasta 1928 en la extracción de mercurio a partir del cinabrio mediante la evaporación del metal por el calentamiento del mineral en hornos (Almansa, 2012). Debido a este prolongado periodo de actividad, la contaminación que ha alcanzado los suelos es muy importante y esta zona es considerada una de las más afectadas por la minería del mercurio en el distrito minero de Almadén.



**Figura 7:** Situación de Almadenejos y mapa de detalle de la zona.



### **1.10. PEÑALSORDO**

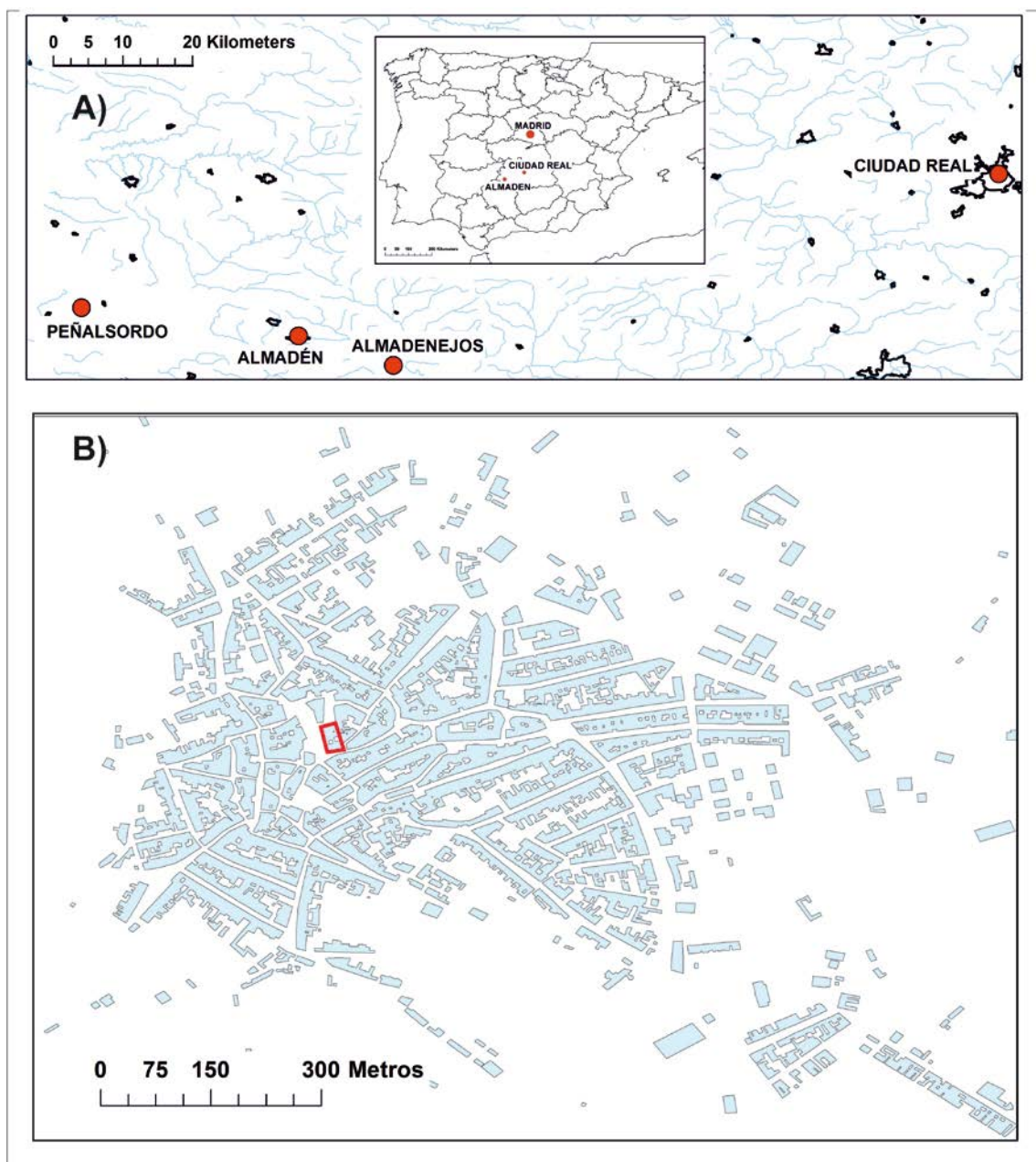
Es un municipio situado en el extremo sureste de la provincia de Badajoz (en la comunidad autónoma de Extremadura), cercano a los límites provinciales de Ciudad Real y Córdoba, a unos 30 km al Oeste de Almadén (figura 8).

Aunque es desconocida la fecha en la que se fundó, se sabe que fue posterior a la reconquista de la zona a los musulmanes, en 1228. El municipio tiene una densidad de 47,33 km<sup>2</sup> contando con 1008 habitantes (INE 2016).

En cuanto a su climatología, muy similar a la de Almadén y Almadenejos, se caracteriza por inviernos lluviosos y veranos cálidos. Su temperatura media anual es de 16.2°C, mientras que su precipitación media aproximada es de unos 496 mm. Cabe destacar que el mes más seco, al igual que caluroso, es julio, con un promedio de 26.9°C, mientras que las temperaturas más bajas son localizadas en el mes de enero, con unos 7.2°C. Su mayor cantidad de precipitación se concentra en marzo, con un promedio de 67 mm.

En los alrededores del pueblo podemos encontrar restos arqueológicos que se remontan al Paleolítico, con el hallazgo de esquirlas y pinturas rupestres esquemáticas; estelas funerarias del periodo orientalizante, con los símbolos de riqueza de sus reyezuelos (cuadros tirados por cuadrúpedos, espadas, espejos...) y restos de población junto a las tablas del río Zújar.

Este municipio está totalmente aislado de la influencia ambiental del mercurio, ya que se sitúa suficientemente alejado del Distrito de Almadén.



**Figura 8:** Situación y mapa urbano de Peñalsordo. El recuadro rojo indica la localización de la casa desde la que se realizaron los experimentos y mediciones que se relacionan con la desorción de mercurio.

## 1.11. DESCRIPCION DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

### 1.11.1. Olivos

La palabra olivo, procedente del latín *olivum*, designa una planta leñosa que se conoce como olivo, aceituno, olivera, siendo su nombre científico *Olea europea* L., de la familia de las Oleáceas.

Este tipo de plantas puede encontrarse dentro del área de influencia mediterránea de cultivos de secano.

El olivo es un tipo de árbol perenne de la familia de las oleáceas que puede llegar a alcanzar hasta los 15 metros de altura. Su tallo suele ser grisáceo cuando el árbol es joven, aunque se va oscureciendo a medida que va envejeciendo, y la corteza se va deshaciendo en forma de placas. (Barranco, 2017).

Sus hojas pueden llegar a medir 8 cm de largo, aunque el tamaño más frecuente es de 4-5 cm x 1 cm, lanceoladas, coriáceas, con un haz brillante y envés blanquecino.

Sus flores se disponen en racimos, compuestas de diez a cuarenta flores, dependiendo de la variedad. Estas flores constan de cuatro pétalos, cuatro sépalos, dos estambres y dos carpelos. La polinización consiste en la transferencia de polen contenido en las antenas de los estambres de una flor al estigma de la misma flor. (Barranco et al., 1996).

Del olivo se obtienen las aceitunas, fruto comestible de donde se extrae el aceite de oliva. El olivo es una especie adaptada al clima mediterráneo. Es sensible a las heladas, aunque durante el reposo invernal puede soportar temperaturas de hasta 10°C bajo cero. Su sometimiento a altas temperaturas es perjudicial, sobre todo durante el periodo de floración; es resistente a la sequía y a suelos calizos.

Órganos de interés:

Hojas: formadas por glucósido oleuropeina, taninos, dextrosa, hidrocarburos, etc.

Frutos: aceite (ácido oleico, ácido graso insaturado, ácido linoleico, grasas sólidas, ácido palmítico y dioleninas).

Partes útiles del olivo: hojas, frutos y corteza, las cuales se utilizan como remedios medicinales.

### **Importancia del olivo en la salud.**

#### **Preparación con las hojas y la corteza del olivo**

Hipotensora: disminuye la presión arterial, siendo muy eficaz en casos de arterioesclerosis, previene la angina de pecho, ya que dilata la arteria coronaria (infusión de unos 60 gr. de hojas secas por litro de agua)

Diurética, antiglucémica: favorece la eliminación de impurezas del organismo, siendo interesante para el tratamiento de diabetes, inflamación del hígado y cálculos biliares (tomar 2 cucharadas de aceite).

Antifebrífuga: rebaja la fiebre (de cocción de 60 gr. de hojas secas durante un cuarto de hora) (Bravo, 2003).

Laxante: en caso de estreñimiento tomar pequeñas cucharadas de aceite de oliva crudo en ayunas.

Hemorroides: se utiliza la corteza.

Anti-colesterol: debido a la riqueza de aceite de oliva, se recomienda su uso, favoreciendo la absorción de las vitaminas E, A, D, y K. Recomendable para la salud del corazón. Existen dos clases de colesterol:

HDL: llamado colesterol “bueno” ya que transporta el colesterol de otras partes del cuerpo hacia el hígado para este eliminarlo del cuerpo.

LDL: llamado colesterol “malo”, quiere decir que hay mucha acumulación de colesterol en las arterias.

Debido a que el aceite de oliva es rico en grasas monoinsaturadas, estas grasas aumentan el colesterol bueno, reduciendo el malo. Se debe tener menos de 100 mg dL<sup>-1</sup> en sangre para tener un nivel de colesterol LDL óptimo, una vez que superan los 130 mg dL<sup>-1</sup> ya se ha sobrepasado el límite recomendable.

#### **Preparaciones curativas con aceite de oliva en uso externo.**

Dermatológico: para curar heridas, llagas o cualquier otra afección de la piel. El aceite de oliva es ideal para suavizar la piel y proporcionarle más humedad, lo cual repercute en una piel más sana y más lisa, libre de arrugas. Esta planta se puede combinar con otras para la elaboración de cremas faciales para pieles secas como: bálsamo, crema para las patas de gallo, para las estrías durante el embarazo.

#### **Propiedades alimenticias del olivo**

Del olivo utilizamos su fruto, es decir, la aceituna (figura 9). Para hacerlas comestibles se realiza un tratamiento adecuado para extraer su acidez. Este procedimiento consiste en someterlas a un baño en sosa cáustica para reducir o eliminar su acidez, y por último se conservarían en salmuera (solución salina muy concentrada), después se sazona al gusto con hinojo, laurel, limón, etc.

En anteriores estudios realizados en el distrito minero de Almadén (Higuera et al., 2012) se observó que existían altas correlaciones entre contenidos elementales en el suelo y el contenido foliar en olivo de los principales elementos del suelo (Fe, Al, Ca), sin embargo, para el caso del mercurio, se detectó poca correlación entre contenidos totales en el suelo y contenidos en las hojas de esta especie vegetal. Por el contrario, el mercurio disponible en el suelo se correlacionó bien con el contenido de la hoja, sugiriendo una captación significativa; además también se pudo apreciar que la incorporación y acumulación de mercurio en las hojas puede deberse a una posible absorción atmosférica. Los contenidos de mercurio que se obtuvieron, tanto en el aceite de oliva local como en las aceitunas, son más altos en muestras tomadas en áreas con concentraciones de mercurio más altas en los suelos; a fecha del estudio (2012), estos valores no suponían un riesgo alimentario; sin embargo, en la actualización reciente de los “límites máximos de residuos de compuestos de mercurio”, en el Reglamento 2018/73 de la Comisión Europea (UE, 2018), los contenidos en aceitunas están, en algunos casos, por encima de estos límites (0,01 mg kg<sup>-1</sup> en esta normativa reciente).

Una de las razones por las que se decidió utilizar el olivo como método de estudio fue el conjunto de datos que se obtuvieron en experimentos anteriores, donde se decía que existía

acumulación de mercurio en hoja debido a una posible absorción atmosférica, además de que dicha especie agronómica es muy extendida tanto en la región en general como en el entorno de Almadén.



**Figura 9:** Aceitunas.

#### **1.11.2. Vid.**

La palabra vid, proviene del latín “*Vitis*” (*vitis vinífera*, L.), perteneciente a la familia de las Vitáceas. Esta especie procede de Asia, cultivada en todas las regiones templadas, distribuyéndose predominantemente por el hemisferio norte (Hidalgo et al., 2011).

Este tipo de planta tiene tronco retorcido, vástagos nudosos y flexibles, llamados sarmientos, hojas alternas, pecioladas, grandes y pentalobuladas, las flores se encuentran reunidas en racimo y su fruto es la uva (figura 10). El estudio y cultivo de las vides se denomina viticultura, ciencia del cultivo de la vid que sirve para usar sus uvas en la producción de vino, de uva de mesa, o de otros productos (López Rodríguez et al., 2004).

Esta planta se diferencia de otros géneros de la familia porque sus pétalos florales se mantienen unidos en el ápice, separándose en la base para formar una caliptra, cobertura cónica que rodea al ápice de la raíz. Los capullos florales se forman al final de la estación de crecimiento y permanecen durante el invierno dentro de las yemas para florecer la primavera siguiente.



**Figura 10:** Plantas de vid en cultivo intensivo.

### **Climatología característica**

La vid es una planta de climas templados y moderados, lo cual permite distinguir dos periodos: actividad vegetativa durante las estaciones calidas y reposo invernal.

En el hemisferio norte, los límites de cultivo de la vid están comprendidos entre 30º y 50º de latitud, abarcando la Península Ibérica y la mayor parte de las islas Baleares y Canarias.

El cultivo de la vid es de secano; por tanto, su distribución y las precipitaciones son importantes, ya que es el único aporte de agua que deben tener.

Existe un intervalo de temperaturas bastante óptimo para los procesos de crecimiento, agostamiento y maduración situado entre 20-25ºC, mientras que superándose los 42ºC se produce desecamientos y quemaduras tanto de hojas como de racimos (Urbina Vallejo et al., 2015). Desde este punto de vista climatológico, hay que recordar que el fruto, la uva, es muy sensible tanto a las temperaturas excesivamente altas como a las inferiores a cero grados.

### **Propiedades alimenticias de la vid**

La vid es la planta que produce las uvas; esta planta tiene gran interés ya que es una fruta agradable y sana, además de servir para hacer zumo, se obtienen otros productos a partir de este zumo, como el mosto, vino y alcoholes vínicos para la elaboración de aguardientes y licores (figura 11).

España es el primer país del mundo en superficie vitícola, pero se sitúa por detrás de Francia e Italia en cuanto a producción mundial, debido a sus limitaciones climáticas, especialmente la pluviometría. La mayor parte del cultivo de viñedo, concretamente el 82 %, se cultiva en secano. El 98 % de la superficie vitícola se dedica a la producción de uva de vinificación, repartándose al 50 % la producción de vinos blancos y tintos. Por su parte, la región de



Castilla-La Mancha se ha convertido en el primer productor de vino de España, contando con más de 500.000 hectáreas y habiendo producido 1944 millones de litros en el año 2018 (MAPAMA, 2019), ocupando el 54,4 % del mercado nacional.

Amorós et al. (2014) estudiaron la captación de elementos traza, entre ellos el mercurio, en plantas de vid del distrito minero de Almadén, observando que el contenido en hoja de Fe, Zn y Pb supera los valores descritos por Higuera et al. (2011) y observaron que existen correlaciones significativas entre el suelo y el contenido en hoja de Hg. Sin embargo, los contenidos de otros elementos trazan en las hojas no muestran relación con el contenido en suelo, debido probablemente a su baja disponibilidad.



**Figura 11:** Cultivos de vid.

El estroncio es uno de los elementos traza que podemos encontrar con mayor acumulación en los suelos vitícolas, debido a su abundancia relativa y su similitud metabólica con el calcio. Se observa que existe una correlación significativa entre el suelo y la hoja, salvo en aquellos suelos que tienen horizonte petrocálcico (Bravo et al., 2014).

La decisión de emplear esta planta agronómica en los experimentos realizados en esta Tesis se relaciona por un lado con la facilidad de obtener plantas jóvenes de la misma anualmente, y por otro lado, a los datos de que ya se disponía de presencia de Hg en sus hojas (Amorós et al., 2014).

## **Captación de mercurio por plantas, controversia radicular y foliar**

Como se indica con anterioridad, y debido a su alta presión de vapor, el mercurio se transforma fácilmente del estado elemental (líquido) al estado gaseoso; las especies gaseosas permanecen durante un largo tiempo en la atmósfera, un periodo variable desde días a más de un año en función de la referencia bibliográfica consultada (Gustin et al., 2008). En todo caso, este extenso tiempo de residencia permite que el mercurio pueda ser transportado a grandes distancias desde las fuentes de emisión. Ello permite realizar investigaciones para comprender el sistema suelo-planta-atmósfera en sitios contaminados, pudiendo observar y caracterizar la absorción en las plantas y así poder determinar si dicha absorción es radicular o foliar, y, además, si es reversible.

Debido a su alta presión de vapor, el mercurio es remitido a la atmósfera desde suelos que lo contienen. Esto nos lleva a la alternativa de que, para una planta que vive en un suelo con altos contenidos en este elemento, la captación se puede producir directamente desde el suelo a través del sistema radicular; o se puede producir por vía foliar, del mercurio reemitido por el suelo a la atmósfera. En el primer caso (captación radicular), el proceso depende de la disponibilidad de ese mismo elemento en suelos; esta concentración “biodisponible” por lo general representa una pequeña fracción de la concentración total, pudiendo ser absorbida por las plantas a través de las raíces y transferidas a las hojas mediante el xilema (De Nicola et al., 2003). Por su parte, la captación foliar depende de la tasa de reemisión del mercurio del suelo, que depende de factores propios (especies presentes en el suelo, con distinta capacidad de emisión de mercurio gaseoso); y de factores externos: temperatura, radiación solar, como indican Llanos et al. (2011); así como de la intensidad del viento, que diluye el mercurio reemitido desde el suelo (Esbrí et al., 2016).

En la actualidad se llevan a cabo diversas investigaciones sobre el mercurio acumulado en las plantas. Algunos investigadores mantienen la idea de que la absorción de mercurio por parte de la planta es radicular, mientras que otros investigadores han observado que la captación es fundamentalmente foliar (Ericksen et al., 2003; Stamenkovic y Gustin, 2009; Higuera et al. (2012a, 2016a) llega a producirse en olivos, vides (Higuera et al., 2016b, Rivera et al., 2017) pinos (Rojas et al. 2016, Barquero et al. 2017), árboles ornamentales (Esbrí et al., 2018) y álamos (*populus*) en Francia (Assad et al., 2016).

### **1.12. OBJETIVOS**

El objetivo principal de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de los flujos de transferencia de mercurio entre el suelo, la planta y la atmósfera. Para conseguir cumplir este objetivo principal, se estudiarán todos estos flujos de forma separada en experiencias de laboratorio y experimentos en condiciones realistas de presencia o ausencia de mercurio en la atmósfera.

Los objetivos secundarios fueron:

Confirmar la absorción radicular de mercurio procedente del suelo y evaluar su importancia en la cantidad total de mercurio captado por la planta.



Confirmar la absorción directa de mercurio procedente de la atmósfera y evaluar su importancia en la cantidad total de mercurio que una planta es capaz de captar.

Evaluar si este proceso de absorción de mercurio por parte de la planta es un proceso reversible, irreversible o una combinación de ambos. En este último caso, evaluar su importancia relativa.

Confirmar que los procesos de desorción de mercurio procedentes de la planta se producen y evaluar su importancia relativa.

Caracterizar los flujos de mercurio entre la parte aérea de una planta modelo y la atmósfera en un sistema controlado de experimentación.

Realizar un balance de masas del mercurio captado y emitido por plantas modelo en situaciones de experimentación controladas y realistas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

En el presente capítulo se describe la metodología seguida y los materiales y equipos empleados durante el proceso de obtención de los resultados de la presente Tesis. Al tratarse de una serie sucesiva de experimentos, se van a describir éstos de forma ordenada, según se han ido realizando, de acuerdo con el siguiente guion:

Primer experimento: captación de mercurio en la interfase planta-atmósfera.

Segundo experimento: situación experimental en ambiente confinado (suelo-planta-atmósfera).

Tercer experimento: captación de mercurio en cultivos, alternativa entre la captación suelo-planta-atmósfera.

Cuarto experimento: absorción/desorción de mercurio en ambiente confinado.

Quinto experimento: desorción de mercurio en cultivos (Olivo).

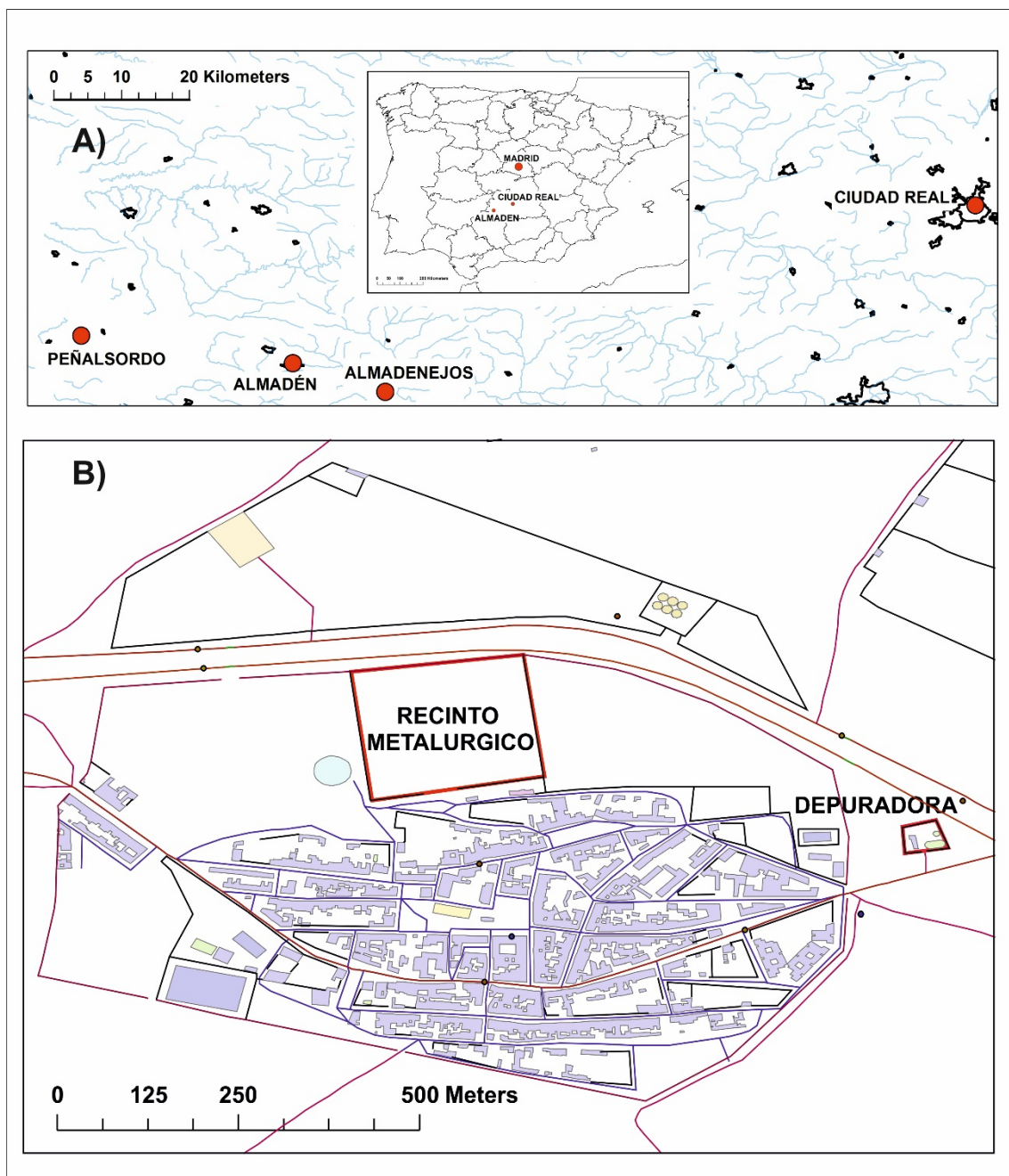
### **2.1. PRIMER EXPERIMENTO: CAPTACIÓN DE MERCURIO EN LA INTERFASE PLANTA-ATMÓSFERA.**

#### **2.1.1. Objetivo**

El objetivo de este experimento ha sido estudiar la acumulación de mercurio que proviene directamente de la atmósfera en las hojas de olivo.

#### **2.1.2. Selección de la zona y monitorización**

La zona seleccionada fue la estación depuradora de aguas residuales de Almadenejos (EDAR). El principal criterio para la selección de esta ubicación fue el extremadamente alto contenido de mercurio atmosférico en la zona, una presencia altamente anómala de MGT. Estas condiciones ambientales permitían la evaluación de la absorción de mercurio por las hojas de olivo a través de los procesos de respiración y/o fotosíntesis de la planta. Este sitio (UTM 30S, 351706E-4289243N y ver figura 12) se caracterizó mediante monitorización en continuo por importantes emisiones, procedentes del cercano recinto metalúrgico de Almadenejos, ya que este recinto es una fuente reconocida como importante fuente emisora de mercurio atmosférico (Martínez-Coronado et al., 2011).



**Figura 12:** Situación de la depuradora EDAR Almadenejos.

La EDAR consiste en una pequeña planta cerrada ubicada a unos 100 m al Este del área urbana, y 430 m al este del recinto metalúrgico (figura 1).

El trabajo experimental en las instalaciones de la EDAR se diseñó para estudiar la captación de mercurio de la planta por vía atmosférica por parte de tres ejemplares de planta de olivo. Las plantas se colocaron el 8/07/2015 y permanecieron en el recinto, expuestas a las condiciones de elevadas concentraciones de MGT hasta el 23/06/2016. La ubicación concreta de las plantas fue en las cercanías de una pared orientada hacia el Este, para evitar que el sol de la tarde afectara a las plantas y las sometiera a un estrés hídrico excesivo.

Durante todo el tiempo que estuvieron las plantas en la EDAR, se monitorizó en continuo el MGT con un dispositivo TEKRAAN 2537B (véase procedimiento analítico para obtener más detalles), mientras que la monitorización de variables meteorológicas se realizó, también en continuo, mediante una estación automática DAVIS VANTAGE PRO (véase procedimiento analítico, apartado 2.6).

La calidad de las mediciones de MGT con el dispositivo Tekran se aseguró realizando calibraciones frecuentes (una cada tres días) con una fuente de permeación interna. En el año 2011, el IGeA participó en un ejercicio de intercomparación entre los equipos Lumex RA-915M y los equipos Tekran 2537B del IGeA y del Instituto de Salud Carlos III. Durante este estudio de intercomparación las medidas de los tres equipos alcanzaron un índice de compatibilidad (ver ref. ISO / IEC, 1997) menor de 1 durante todos los experimentos (Fernández-Patier y Ramos-Díaz, 2011), lo que garantiza la calidad de las mediciones realizadas con todos estos equipos.

### **2.1.3. Toma de muestras y preparación**

Durante el experimento en la EDAR, la recolección y preparación de las muestras se realizó de la siguiente forma: cada 15 días se tomaron muestra de hojas, usando guantes de nitrilo sin polvo y pinzas de acero inoxidable. Posteriormente se depositaban las hojas en un bote de polipropileno de 50 ml de capacidad. Cada muestra consistió en la mezcla de cinco hojas tomadas en cada uno de los periodos de muestreo, procedentes de distintas partes de la planta (superior, centro e inferior), haciendo un total de 330 muestras durante el periodo del experimento.

Una vez recogidas estas muestras, se llevaron al laboratorio, congelaron y liofilizaron con el equipo liofilizador de marca TELSTAR, modelo CRYODOS (véase procedimiento analítico), para posteriormente analizarlas. El siguiente paso fue la trituración de las hojas usando un molinillo comercial de café, de marca Orbegozo, modelo MO 3250. Este equipo triturador solo se usó en estas muestras con el fin de evitar la contaminación cruzada con otras procesadas en el laboratorio del IGeA y así obtener una muestra homogénea y de calidad antes del análisis.

Después de la trituración de las muestras, se determinó su contenido en mercurio total mediante el espectrómetro de absorción atómica de marca LUMEX, modelo RA-915+ (véase métodos analíticos).

## **2.2. SEGUNDO EXPERIMENTO: SITUACIÓN EXPERIMENTAL EN AMBIENTE CONFINADO (suelo-planta-atmósfera)**

### **2.2.1. Objetivo**

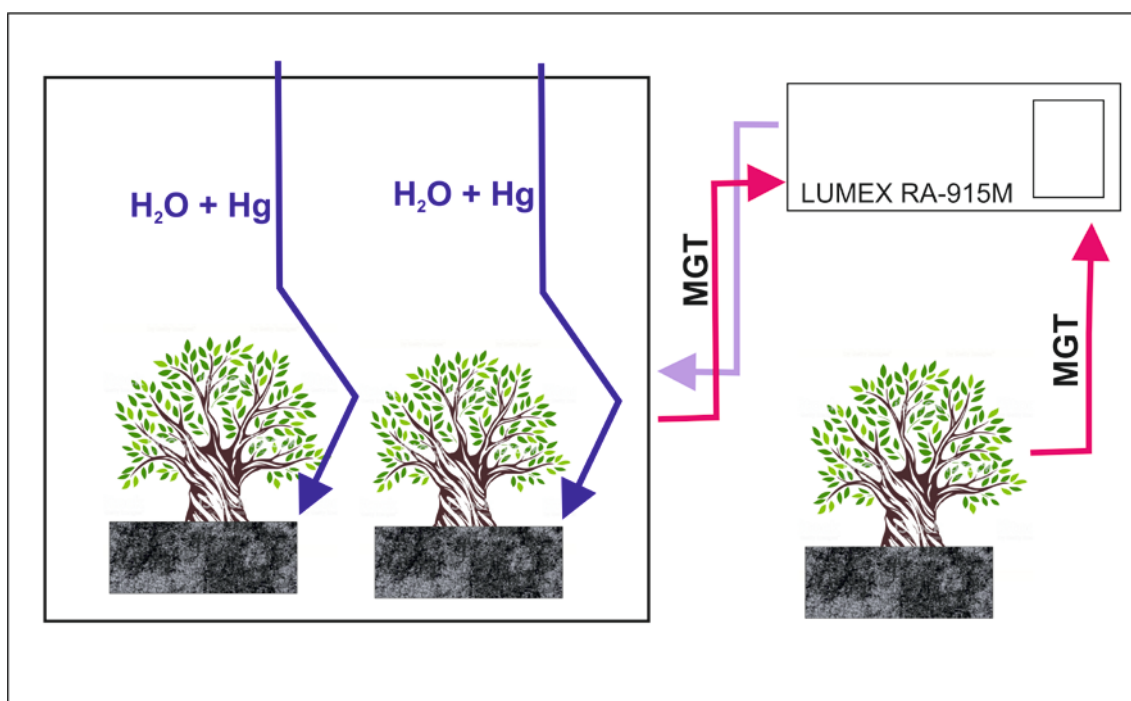
El presente experimento tuvo como objetivo estudiar la posible acumulación de mercurio en hojas mediante absorción radicular.

### **2.2.2. Selección de la zona y monitorización**

El criterio para seleccionar la zona de trabajo en este experimento fue la presencia de mercurio en la atmósfera en concentraciones relativamente bajas. Con esta situación se pretendía asegurar que todo el mercurio introducido en el sistema suelo-planta- atmósfera procediera del mercurio añadido al agua de riego, y no hubiera presencia externa de mercurio procedente de otras fuentes de emisión y disponible para adquisición por vía atmosférica.

Para el desarrollo del trabajo experimental se adquirieron tres plantas de olivo, libres de mercurio, en un vivero comercial situado a unos 30 km de Almadén. Estas plantas de olivo fueron posteriormente trasladadas al exterior del Laboratorio de Biogeoquímica de Metales Pesados del IGeA, situado dentro del recinto de la Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén (EIMIA). Esta Escuela se localiza relativamente alejada de los focos activos de emisión de mercurio de la localidad, descritos por Tejero-Manzanares et al. (2015). El experimento se realizó en el periodo comprendido desde el 29/10/2015 hasta 18/05/2016.

El desarrollo del experimento transcurrió del siguiente modo (figura 13): dos ejemplares de olivo fueron aislados en una caja de policarbonato, mientras que un tercer ejemplar de olivo se dejó expuesto a las condiciones ambientales del entorno. La caja de policarbonato tenía unas medidas de 100 cm de largo x 100 cm de ancho x 50 cm de profundidad. En la cara superior tenía dos perforaciones de 7 mm de diámetro cada una, para introducir dos tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 4 mm de diámetro interior y 6 mm de diámetro exterior.



**Figura 13:** Diseño del experimento de captación radicular. Abreviatura: Mercurio Gaseoso Total (MGT).

Durante todo el tiempo de desarrollo de este experimento se monitorizó el mercurio atmosférico mediante dispositivos LUMEX RA-915, tanto dentro como fuera del cajón de policarbonato, de forma que se dispusiera de datos de exposición al mercurio para todos los ejemplares. También se monitorizó la meteorología correspondiente al periodo de experimentación con una estación automática DAVIS VANTAGE PRO (véase métodos analíticos).

Los tres ejemplares de olivo eran regados una vez por semana con una solución conteniendo nitrato de mercurio, con una concentración de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para poder regar los olivos que estaban dentro de la caja de policarbonato, se utilizaron los tubos de Teflón antes descritos, tapando la parte que quedaba al aire para evitar que entrara mercurio atmosférico. El riego se

realizaba a través de los tubos mediante una jeringa, sin necesidad de levantar la caja, por lo que las plantas permanecieron confinadas dentro de la caja durante todo el experimento.

### **2.2.3. Toma de muestras y preparación**

La realización de la toma de muestra se realizó mediante el siguiente procedimiento: la frecuencia de muestreo fue de 7 días para su recolección era necesario levantar la caja de polycarbonato la recolección se realizaba usando tijeras de jardinero y guantes de nitrilo sin polvo las hojas recolectadas se depositaban en un bote de polipropileno de 50 ml se recogían 5 hojas cada toma de muestra de distintas partes el olivo (superior, centro e inferior) el número total de muestras fue de 57 muestras durante el periodo del experimento tras el muestreo se procedía al riego, según se ha descrito anteriormente.

Una vez recogidas estas muestras, se llevaban al laboratorio y se congelaron. Tras su congelación, y previamente a su análisis, se liofilizaban con el equipo liofilizador de marca TELSTAR, modelo CRYODOS (véase procedimiento analítico, apartado 2.6).

Una vez liofilizadas las muestras, eran trituradas con un molinillo comercial de café de marca Orbegozo, modelo MO 3250. Para evitar la contaminación cruzada con otras muestras del laboratorio del IGeA, se evitó usar el molinillo de café en otros proyectos. El análisis de mercurio total en las muestras se realizó mediante espectrometría de absorción atómica, con un equipo de marca LUMEX, modelo RA-915+ (véase procedimiento analítico, apartado 2.6).

Para el posterior tratamiento de datos se calcularon las medias estacionales y anuales de mercurio atmosférico a partir de los promedios diarios.

Además, en las proximidades de la toma de muestra del TEKRA, se situó la estación meteorológica DAVIS VANTAGE PRO para la monitorización de la micrometeorología local.

## **2.3. TERCER EXPERIMENTO: CAPTACIÓN DE MERCURIO EN CULTIVOS: ALTERNATIVA ENTRE LA CAPTACIÓN SUELO-PLANTA-ATMÓSFERA**

### **2.3.1. Objetivo**

El presente experimento tuvo como objetivo realizar un análisis comparativo de los anteriores experimentos de captación de mercurio que proviene del suelo en las hojas de olivo, exponiendo a las plantas de estudio a diferentes condiciones ambientales de mercurio atmosférico.

### **2.3.2. Selección de la zona y monitorización**

Las zonas seleccionadas para este trabajo experimental fueron elegidas en base a sus diferentes contenidos habituales de mercurio atmosférico, es decir, se seleccionó un área con contenidos extremadamente altos (estación depuradora de aguas residuales de Almadenejos), y otra con contenidos considerados de fondo geoquímico de MGT (laboratorios de la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos de Ciudad Real).

La descripción de la EDAR de Almadenejos se ha realizado en el apartado 2.1.2.

Ciudad Real (situado a unos 100 km al NE de Almadenejos), se consideró como un lugar de referencia en términos de bajas concentraciones de mercurio atmosférico, lo que permite

considerarlo como un lugar apropiado para estudiar la absorción radicular de los suelos en ausencia de mercurio atmosférico. Las plantas se colocaron desde marzo de 2016 hasta junio de 2016 en el Laboratorio de Cultivos Leñosos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Ciudad Real (UCLM) (UTM 30S, 420341E – 4315716N).

La monitorización del mercurio atmosférico se realizó con dos equipos distintos: un espectrómetro de absorción atómica de marca Lumex, modelo RA-915+ en la zona de valores bajos de MGT (Ciudad Real) y un espectrómetro de fluorescencia atómica de marca Tekran, modelo 2537B, en la zona de altos contenidos de MGT (Almadenejos).

Este experimento consistió en la adquisición de 12 ejemplares de olivo, libres de mercurio, de un vivero comercial de Alcaracejos (Córdoba), pueblo situado a unos 55 km al Sur de Almadenejos (Ciudad Real). Seis plantas de olivo se dejaron expuestas al MGT en su emplazamiento de la EDAR. También se utilizaron 12 plantas de vid, obtenidas en el Laboratorio de Cultivos Leñosos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Ciudad Real a partir de sarmientos y posteriormente trasplantadas a macetas, para después trasladar 6 plantas de vid a la EDAR de Almadenejos (Ciudad Real). El resto de las plantas de olivo y vid (6) se llevaron a Ciudad Real, para analizar su comportamiento en ambiente libre de mercurio gaseoso.

El periodo de tiempo que estuvieron las vides en Almadenejos fue de cuatro semanas, mientras que los olivos estuvieron durante nueve semanas. Esta diferencia de tiempo se debió a que las plantas de vid tenían menor número de hojas muestreables y se fueron agotando conforme avanzó el muestreo hasta no quedar hojas muestreables transcurridas 4 semanas.

El tiempo de exposición en ciudad Real fue común a las dos plantas (vid y olivo), en total cinco semanas.

Posteriormente se decidió hacer un segundo experimento más extenso en el tiempo con plantas de vid, pero esta vez en Puertollano (ciudad donde existe baja presencia de MGT), monitorizando el mercurio gaseoso y teniendo las plantas expuestas un periodo más largo. Esta localidad se encuentra situada a unos 66 km de Almadenejos, y se considera como un lugar apropiado para estudiar la absorción radicular de los suelos en ausencia de mercurio atmosférico, ya que está descrita por Martínez-Coronado et al (2016) como una ciudad con valores de fondo en términos de MGT. En este caso, se utilizaron 10 plantas de vid, ubicadas dentro de la misma bandeja y divididas en tres grupos. Estas plantas permanecieron en Puertollano desde el 17 de Julio de 2016 hasta el 18 de septiembre de 2016, ubicadas en un balcón estrecho con orientación Sur (30S 403787E 4282597N).

### **2.3.3. Toma de muestras y preparación**

El sistema que se empleó para la recogida de muestras de hojas de los olivos en Almadenejos fue el siguiente: la frecuencia de muestreo fue de siete días las muestras se tomaron a mano usando guantes de nitrilo sin polvo las muestras se introdujeron un bote de polipropileno de 50 ml de capacidad se recogían cinco hojas en cada muestra, tomadas de distintas partes el olivo (superior, centro e inferior), diferenciando las hojas jóvenes de las hojas viejas.

En el caso de las plantas de vid, el sistema empleado era el mismo que para los olivos, con la diferencia que en estas plantas sólo se recogía una hoja.

Para la toma de muestras de hojas de los olivos y vid instalados en Ciudad Real el proceso fue el siguiente: la frecuencia de muestreo fue de siete días las muestras se tomaron a mano usando guantes de nitrilo sin polvo las muestras de hojas se depositaban en un bote de polipropileno de 50 ml de capacidad el número de hojas de la muestra de olivo era de cinco y en las muestras de vid de una.

Las muestras recogidas en Ciudad Real se congelaban para después trasladarlas a Almadén, donde se seguía el mismo procedimiento que el descrito para las muestras recogidas en Almadenejos.

Estas muestras se llevaban al laboratorio para congelarlas. Una vez congeladas se liofilizaron, para posteriormente poder analizarlas. Una vez secas, se trituraban con un molinillo de café Orbegozo MO 3250, de uso exclusivo para estas muestras.

Triturada la muestra, pasaba a su posterior análisis.

Una vez que terminado el experimento, se procedió a la disección del total de muestra restante (tallo, raíces y suelo) de las plantas de vides, tanto de Almadenejos como de Ciudad Real. La disección de cada muestra se realizó a mano, usando guantes de nitrilo sin polvo y lavando minuciosamente las plantas con agua de grifo antes de su secado en estufa.

Para el posterior tratamiento de datos, se calcularon las medias estacionales y anuales de concentración atmosférica de mercurio a partir de los promedios diarios de concentración de MGT. Además, en las proximidades de la toma de muestra del TEKRAN, se situó la estación meteorológica DAVIS VANTAGE PRO para la monitorización en continuo de las variables meteorológicas.

En el experimento de Puertollano, las plantas se regaron del siguiente modo: Desde la planta 1 a la planta 4, se regadas con una solución de nitrato de mercurio con una concentración de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Desde la planta 5 a la planta 8, se regaron con agua mineral. Mientras que las plantas 9 y 10 fueron reservadas por si el estrés hídrico del mes de agosto producía bajas en el experimento.

Se realizaron 4 muestreos cada 15 días, mientras que el riego se hacía cada 7 días, además de las mediciones de MGT que se hacían desde distintas partes de la casa y en el balcón en el que estaban las plantas.

Al finalizar el experimento en Puertollano, estas plantas se llevaron a Almadén, concretamente el día 18 de septiembre de 2016, donde se dejaron en un invernadero de la EIMIA bajo unas condiciones de altos contenidos de mercurio en el aire y sin adición de mercurio en el agua de riego. En este tiempo se realizaron monitorizaciones de MGT.

Mientras que las plantas estuvieron en Puertollano, las muestras que se tomaron se mantuvieron congeladas hasta que se trasladaron a Almadén, donde se metieron en la estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ , durante 26 horas. Posteriormente, se unieron los cuatro replicados con mercurio en el



agua de riego (plantas 1 a la 4) y sin mercurio añadido en el agua de riego (planta 5 a la 8) en uno, y se homogeneizaron por medio de unas pequeñas tijeras que se limpiaban con papel entre muestra y muestra. A continuación, se analizaron por espectrometría de absorción atómica con efecto Zeeman, usando para ello el equipo comercial de marca Lumex, modelo RA-915+ con el equipo pirolizador PYRO-915.

## **2.4. CUARTO EXPERIMENTO: DESORCIÓN DE MERCURIO EN CULTIVOS (OLIVO)**

### **2.4.1. Objetivo**

El presente experimento tuvo como objetivo estudiar la desorción de mercurio procedente de las hojas de olivo que previamente habían captado mercurio de la atmósfera en Almadenejos.

### **2.4.2. Selección de la zona y monitorización**

La zona seleccionada para este trabajo experimental fue la pequeña localidad de Peñalsordo (Badajoz, a unos 40 km al Oeste de Almadenejos), debido a su baja presencia de MGT, con el objetivo de evaluar la posibilidad de desorción de mercurio de las hojas de olivo a través de los procesos de respiración y/o fotosíntesis.

En este experimento, las plantas quedaron expuestas al aire libre, en contacto con la atmósfera abierta. Las plantas previamente expuestas al MGT en la EDAR se mantuvieron en la terraza de una vivienda de esta localidad (UTM 30S, 316300E – 4298963N) desde el 23 de junio de 2016 al 11 septiembre de 2016. Como se indica en la Introducción (apartado 10). Peñalsordo es una pequeña localidad agrícola (1008 habitantes, INE 2016) ubicada a 21 km al Oeste de la ciudad de Almadén. Nunca se han descrito fuentes de mercurio en este lugar y, por lo tanto, se esperaba que las concentraciones atmosféricas de mercurio fueran los valores de referencia típicos. Las mediciones de MGT se llevaron a cabo con la ayuda de un equipo de absorción atómica con efecto Zeeman de marca Lumex, modelo RA-915M (véase en procedimiento analítico, apartado 2.6) en modo continuo.

### **2.4.3. Toma de muestras y preparación**

El sistema que se empleó para la recogida de muestras de hojas de los olivos en Peñalsordo fue el siguiente: La frecuencia de muestreo fue de siete días el muestreo se realizó a mano, usando guantes de nitrilo sin polvo las muestras se depositaron botes de polipropileno de 50 ml de capacidad

Cada muestra contenía cinco hojas tomadas de distintas partes el olivo (superior, centro e inferior), diferenciando las hojas jóvenes de las viejas, es decir, cogiendo cinco muestras de hojas jóvenes y hojas viejas.

Todas las muestras se llevaban al laboratorio inmediatamente para su congelación. Una vez congeladas, se secaban en estufa a una temperatura de 45°C, para posteriormente poder triturarlas con un molinillo de café Orbegozo MO 3250, de uso exclusivo para estas muestras.

Triturada la muestra, pasaba a su posterior análisis.

Para el posterior tratamiento de datos, se calcularon las medias estacionales y anuales de concentración atmosférica de mercurio a partir de los promedios diarios de concentración de MGT.

Una vez analizadas dichas muestras, se recogieron muestras de hojas de olivo de dos olivares de la población situados en proximidad de la población (WGS84 30S 317211E 4299155N) y (WGS84 30S 316590E 4299476N), para poder comparar las concentraciones de mercurio que existen en la zona, en ausencia de fuentes de emisión conocidas de este elemento.

## **2.5. QUINTO EXPERIMENTO: ABSORCIÓN/DESORCIÓN DE MERCURIO EN AMBIENTE CONFINADO**

### **2.5.1. Objetivo.**

El presente experimento tuvo por objeto medir los ciclos diarios de absorción/desorción de mercurio por una especie de planta concreta, para confirmar las conclusiones a las que se llegó con los experimentos anteriormente descritos.

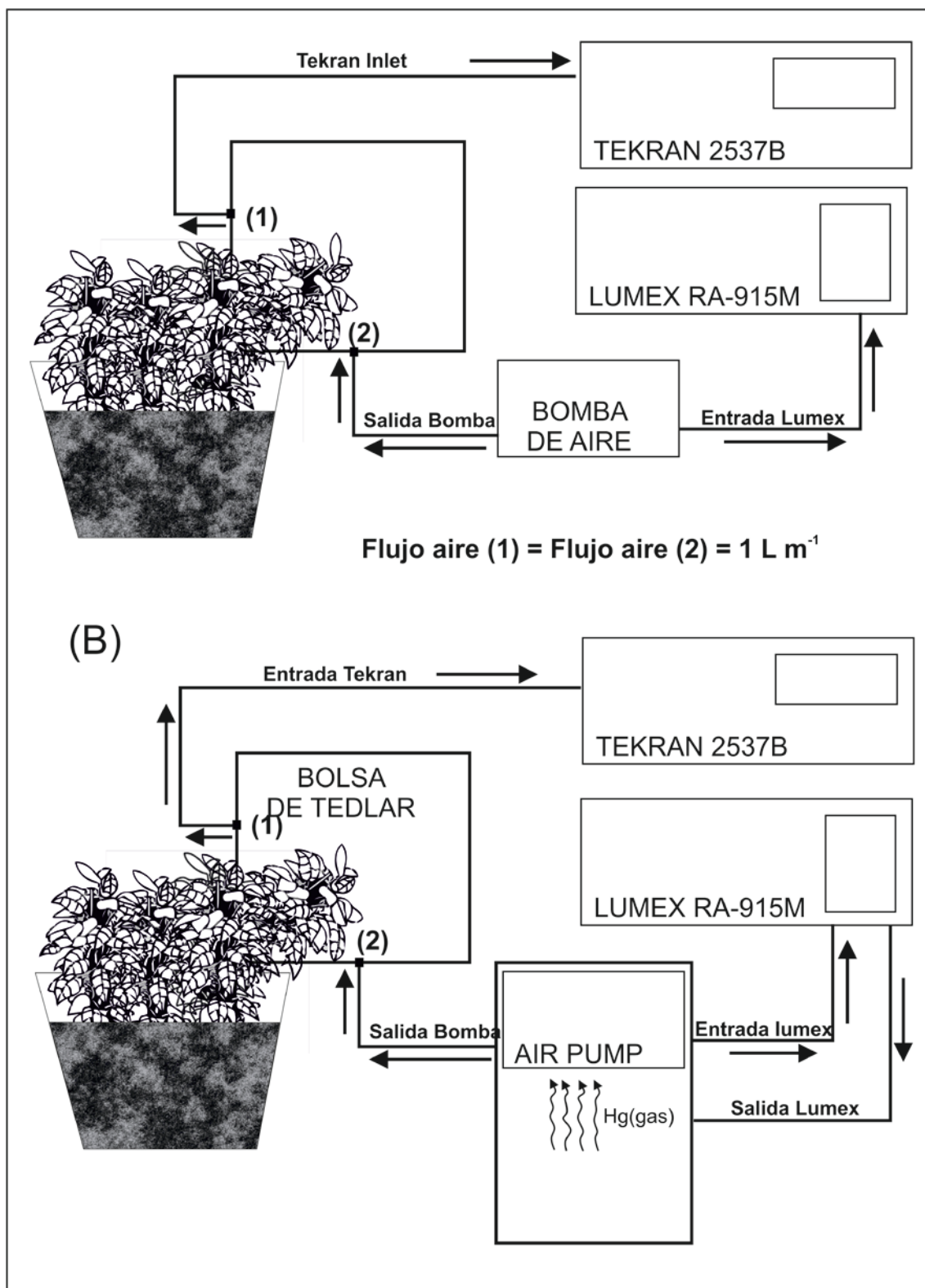
### **2.5.2. Selección de la zona y monitorización**

La zona elegida para el trabajo experimental fue el Laboratorio de Cultivos Leñosos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Ciudad Real (UCLM) (UTM 30S, 420341E – 4315716N).

Este experimento fue diseñado para confirmar las conclusiones a las que se había llegado con los experimentos anteriormente descritos; en concreto, este experimento pretendió medir los ciclos diarios de absorción/desorción de mercurio usando una planta común (*Epipremnum aureum* L&A, poto por su nombre común) confinada en una bolsa de Tedlar (figura 14). Se ha elegido este tipo de material por ser el más usado en bolsas de toma de muestras de gases, ya que tiene baja permeabilidad a los gases y baja capacidad de producir contaminación cruzada.

Las mediciones de MGT dentro de la bolsa se llevaron a cabo mediante un equipo de Fluorescencia atómica (Tekran 2357B) mientras que fuera de la bolsa, la monitorización se hizo mediante el equipo de absorción atómica (Lumex RA-915M).

El dispositivo Tekran 2357B fue el elegido para las medidas dentro de la bolsa debido a su capacidad de limitar el caudal y el tiempo de muestra; estos aspectos son muy importantes para mantener el volumen de la bolsa constante durante todo el experimento, mientras que el Lumex RA-915M se eligió para las mediciones de ambiente externo porque tiene suficiente exactitud y precisión, ya que, para medir fuera de la bolsa, no se necesitaban requerimientos especiales. Estos equipos han demostrado ser compatibles para medir simultáneamente un mismo fenómeno durante el análisis de intercomparación que se realizó en el laboratorio del IGeA en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III, durante el cual, los citados equipos mostraron un índice de compatibilidad (ISO/IEC, 1995) menor de 1 (Fernández-Patier y Ramos-Díaz, 2011). El control de calidad de las medidas del equipo Tekran se ha asegurado comprobando la calibración con una fuente de permeación interna cada tres días y recalibrando cada semana. Este mismo control de calidad en el equipo Lumex ha consistido en la realización de una prueba de verificación antes de cada medida con una fuente interna de vapor de mercurio, que controla la deriva del equipo. Aunque el fabricante admite una desviación inferior al 20%, el equipo se mantuvo siempre por debajo del 3%.



**Figura 14:** Diseño de los dos experimentos de desorción (A) y absorción (B).

A lo largo del experimento, también se han obtenido datos de temperatura, humedad relativa, radiación solar, presión atmosférica, punto de rocío y evapotranspiración. Estas mediciones se han realizado en distintos puntos del área de realización del experimento mediante medidores portátiles, con datalogger, de marca EL-USB-2, modelo Lascar, capaces de almacenar una gran cantidad de datos de forma continua. Mientras, la radiación solar, punto de rocío y

evapotranspiración se ha medido con una estación meteorológica Davis Vantage Pro automática, con consola y datalogger para almacenar los datos cuarto-horarios.

### **2.5.3. Toma de muestras y preparación**

Durante el tiempo del experimento (35 días) se procuró que la planta recibiera luz indirecta del día, para que no estuviera al sol en ningún momento. Se utilizó una bomba de aire comercial para introducir en la bolsa el mismo caudal de aire que el Tekran extraía de forma continua ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ) y así poder mantenerla con volumen de aire constante en su interior, mientras el contenido en mercurio de este aire que se introducía en la bolsa era monitorizado por el equipo analítico Lumex (figura 14). Se utilizaron distintas configuraciones del experimento para estudiar la desorción y la absorción. EL experimento de desorción se realizó como se indica en la figura 14A, con la bomba en el exterior del laboratorio de cultivos leñosos. El experimento de absorción se realizó como se indica en la figura 14B, con la bomba confinada en una caja opaca con una fuente de emisión de mercurio en su interior.

## **2.6. PROCEDIMIENTO ANALITICO**

### **2.6.1. Mercurio total en muestras biológicas.**

El procedimiento analítico que se llevaba a cabo para todos los experimentos era el mismo: se usaba un espectrómetro de absorción atómica con efecto Zeeman de marca Lumex, modelo RA-915+.

El primer paso era el de calibración del equipo mediante el material de referencia certificado 2710a (Montana Soil) se comprobaba la exactitud de las medidas con el análisis de un material de referencia certificado de la misma matriz que las muestras. En el caso de las plantas era un BCR62 de hojas de olivos una vez realizado el calibrado del equipo LUMEX RA-915+, se realiza el pesado de las muestras secas en una balanza analítica de alta precisión O-Haus Adventure ProAV 264C, que dispone de cinco unidades de discriminación con un error de 0,1 mg y con un rango de medidas que llega hasta los 260 gramos las muestras pesadas se introducen en el analizador, procediendo a su calcinación y a la cuantificación del mercurio total integrando el área del pico de desorción. los análisis se realizaron siempre sobre muestra seca.

### **2.6.2. Mediciones de MGT usando el equipo Tekran 2537B**

El equipo marca Tekran modelo 2537B es un espectrómetro de fluorescencia atómica que analiza mercurio gaseoso elemental y es utilizado para la monitorización de mercurio gaseoso en el contexto de esta Tesis y en otros trabajos del Grupo de Investigación (Esbrí et al., 2015; Martínez-Coronado et al., 2016; Naharro et al., 2018). Este dispositivo realiza un análisis en continuo del total de mercurio que se encuentra en el aire en niveles incluso inferiores a los  $\text{ng m}^{-3}$ , es decir,  $\text{pg m}^{-3}$ . Las especificaciones técnicas del equipo se muestran a continuación (tabla 1).

Este instrumento toma muestras de aire por bombeo, atrapando el mercurio contenido en una trampa que contiene un cartucho revestido con oro ultra puro, sobre el que se amalgama el mercurio. A intervalos regulares esta amalgama es desorbida térmicamente, liberándose el mercurio, que es arrastrado a la celda analítica, donde es cuantificado usando un espectrómetro de fluorescencia atómica. El equipo contiene dos trampas de vapor que se usan

alternadamente, una atrapando la muestra y otra desorbiéndola, lo que permite medidas discontinuas con una frecuencia entre muestras sucesivas de 15 minutos.

Límites de detección (para 7,5 litros de muestra)	<0,1 ng m <sup>-3</sup>
Rango	<0,1 – 10.000 ng m <sup>-3</sup>
Linealidad	2 %
Caudal	0,5 – 1,5 LPM
Ciclo de muestra	2,5 – 20 minutos
Tiempo de subida >95%	Dentro de un ciclo
Tiempo de caída >95%	Dentro de un ciclo
Tiempo de calentamiento	15 minutos.

**Tabla 1:** Especificaciones del Modelo 2537B.

El equipo se controla mediante un microprocesador integrado, que permite un amplio rango de medidas. El software del equipo permite alterar los parámetros de medición, permitiendo adaptarlo a la situación en que se encuentre. Este instrumento se controla mediante 16 botones y una pantalla LCD situados en el frontal del equipo (figura 15).

Para controlar el flujo de muestra a través de las trampas se emplea un medidor de flujo. El microprocesador integra el flujo de entrada de aire durante todo el tiempo para proporcionar al equipo el volumen de aire medido en cada muestra.

El equipo también dispone de un mecanismo por el cual el mercurio residual es desorbido desde el oro en el cartucho antes de ser usado para cualquier análisis. Este procedimiento se pone en marcha automáticamente en cada cartucho antes de llevarse a cabo una calibración o análisis. Además, el equipo se programa para que realice una limpieza cada pocos ciclos, para eliminar el “efecto memoria” asociado a los filtros de oro.

El equipo tiene también la capacidad de poder ser calibrado mediante una inyección manual con una fuente de permeación externa.



**Figura 15:** Equipo Tekran modelo 2537B. Analizador de mercurio vapor.

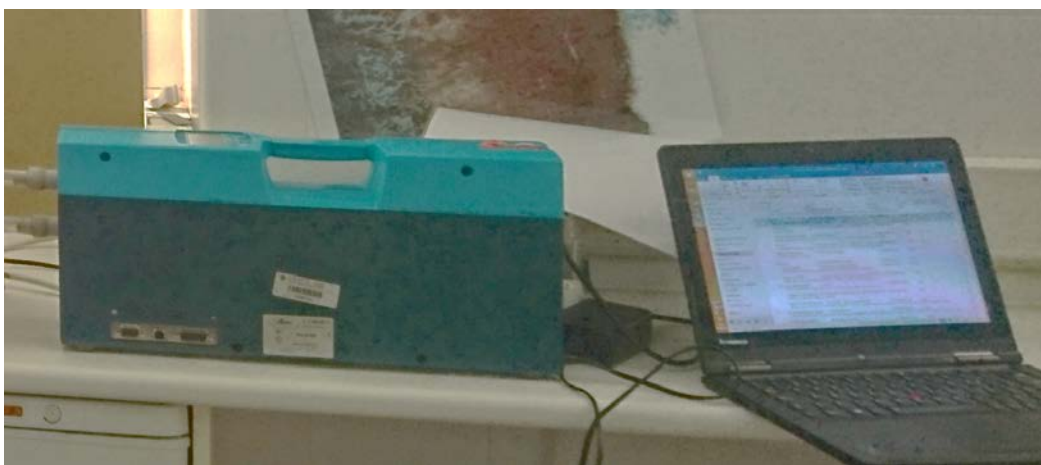
### 2.6.3. Mediciones de MGT usando el equipo LUMEX RA-915+

Es un equipo comercial portátil cuyo funcionamiento se basa en la técnica de espectroscopia de absorción atómica con efecto Zeeman usando una luz polarizada de alta frecuencia (EAAZ-MAF) para analizar el mercurio gaseoso en el aire.

Este equipo consta de dos entradas, una de aire cero para ajustar la línea base y la otra de toma de muestra, a través de la cual se bombea un caudal definido desde el exterior del equipo hasta la celda analítica, para su cuantificación (figura 16). En este proceso se utiliza el efecto Zeeman para hacer más selectiva la medida y evitar interferencias (Sholupov et al., 2004). Este equipo permite además analizar muestras sólidas mediante un dispositivo adicional, el pirolizador RP-91 C y el modelo más actual PYRO-915.

Su límite de detección para mercurio en aire es de  $2 \text{ ng m}^{-3}$  en intervalos de 10 segundos. Las medidas pueden ser validadas mediante el uso de una celda con concentración conocida de vapor de mercurio, que se usa como comprobación en función de la temperatura de trabajo. También se realiza un ajuste de la línea de base utilizando aire libre de mercurio obtenido mediante filtros integrados de absorción específicos.

Su calidad fue verificada por el *Advanced Monitoring Systems Center* (EE. UU.) mientras se realizaban estudios encargados por la USEPA en el año 2001. Las medidas llevadas a cabo en aire cumplen con los estándares europeos CSN EN 15852. (European Standards 2013). Además de esto, los equipos propiedad del IGeA han superado un análisis de intercomparación con el Instituto de Salud Carlos III (Fernandez-Patier y Ramos-Díaz, 2011).



**Figura 16:** LUMEX RA-915+. Espectroscopia de absorción atómica.

Este equipo se ha utilizado en multitud de estudios, para caracterizar niveles de mercurio gaseoso elemental, aislar fuentes de emisión y establecer riesgos relacionados con la sobreexposición, debido a que es capaz de realizar mediciones tanto de los valores de fondo como de valores anómalos comunes en ambientes abiertos.

Varios de esos trabajos se citan a continuación: se evaluó la exposición del personal del Herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, donde las plantas se trataron desde la década de los 1970s con  $\text{HgCl}_2$  (Oyarzún et al., 2007). Esbrí et al. (2015) determinaron que en las proximidades de una planta cloro-álcali en Flix (Tarragona)

había contaminación atmosférica por mercurio, correlacionable con los contenidos en un biomonitor (líquenes) y con un modelo de dispersión gaussiano. Más tarde, se ha publicado un estudio acerca de las variaciones temporales, tanto estacionales como diurnas, junto con los factores de influencia en sitios contaminados, (Esbrí et al., 2016), mientras que Carmona et al. (2013) describen las emisiones directas desde suelos con distintos contenidos en mercurio realizados a escala de laboratorio.

Este equipo ha sido de mucha utilidad en numerosos análisis y lugares, debido a su alta manejabilidad y portabilidad. Tiene especial interés los estudios que ha realizado el IGeA desde el año 2002 en el Distrito Minero de Almadén (Higuera et al., 2003; Molina et al., 2006; Martínez-Coronado et al., 2011; Llanos et al., 2011; Higuera et al., 2012c).

#### **2.6.4. Adquisición de datos micrometeorológicos mediante una Estación meteorológica automática DAVIS VANTAGE PRO**

Esta estación meteorológica (figura 17) trabaja de forma automática, recogiendo datos en periodos de tiempo de 15 minutos, en los cuales toma valores de temperatura ambiental, humedad relativa, radiación solar, velocidad y dirección de viento, radiación ultravioleta, presión barométrica y lluvia. Hay otros parámetros como el punto de rocío o la evapotranspiración que se calculan a partir de estos parámetros.



**Figura 17:** Estación meteorológica Davis Vantage Pro.

#### **2.6.5. Liofilización de muestras biológicas usando un equipo TELSTAR CRYODOS.**

El liofilizador es un aparato que sirve para llevar a cabo la desecación de muestras biológicas mediante sublimación de su humedad contenida, y cuyas dimensiones son 600 x 720 x 690 mm (figura 18). El proceso de liofilización consiste en introducir las hojas congeladas en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación y conseguir una total



dsecación de la muestra correspondiente antes del análisis. El dispositivo alcanzaba una temperatura de trabajo de -53,7°C y un vacío de 0,175 mBar.

Este equipo consta de:

- Un compresor frigorífico hermético, ubicado en una base de sobremesa formada por un mueble metálico de acero, lacado y secado al horno.
- Una bomba de vacío externa, la cual está prevista de gas **ballast** para eliminar tanto el vapor de agua como los vapores condensables contenidos en el aceite.
- Un condensador consistente en un serpentín coaxial, el cual podemos encontrar en el interior de un manifold tipo tambor.
- Este liofilizador consta de 8 válvulas de goma de ¾" de 18 mm de diámetro, permitiendo acoplar accesorios para liofilizar simultáneamente en frascos.
- Una pantalla digital que da lectura continúa de la temperatura del condensador y del vacío (sistema de control por microprocesador).



**Figura 18:** Liofilizador dispuesto en el laboratorio del IGeA con detalle de las condiciones de trabajo.

En esta imagen se puede observar los botes con las hojas, mientras se secaban para su posterior análisis.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los objetivos de la presente Tesis abarcan distintos aspectos del flujo de Hg en el ciclo biogeoquímico que engloba al suelo, la planta y la atmósfera. Para obtener información suficiente que dé respuesta a los objetivos marcados, se diseñaron distintos experimentos que intentaban aislar las distintas rutas de adquisición o emisión de Hg que presenta una planta, es decir: acumulación directa desde el suelo, acumulación directa desde el agua disponible en el suelo, acumulación directa desde la atmósfera y emisión directa hacia la atmósfera.

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos en los distintos experimentos que se han realizado:

- Primer experimento: captación de mercurio en la interfase planta-atmósfera.
- Segundo experimento: situación experimental en ambiente confinado (suelo-planta-atmósfera).
- Tercer experimento: captación de mercurio en cultivos, alternativa entre la captación suelo-planta-atmósfera.
- Cuarto experimento: absorción/desorción de mercurio en ambiente confinado.
- Quinto experimento: desorción de mercurio en cultivos (Olivo)

#### 3.1. Primer experimento: captación de mercurio en la interfase planta-atmósfera.

En este primer experimento se ha estudiado el flujo de mercurio que se produce directamente entre la planta y la atmósfera. Como localidad del estudio se seleccionó Almadenejos, una pequeña población dentro del distrito minero de Almadén con condiciones adecuadas para el experimento, debido a la presencia altamente anómala de MGT. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

La tabla 2 muestra los contenidos en Hg total en las hojas de olivo durante su exposición al mercurio gaseoso atmosférico en la depuradora de aguas residuales de Almadenejos. Los datos ofrecidos en la tabla corresponden, como ya se ha descrito en la sección de materiales y métodos, a 24 muestreos de cada olivo, haciendo un total de 72 muestras compuestas de cinco muestras por olivo durante un ciclo anual (11 meses de exposición total). También se incluyen en la tabla, a efectos comparativos, algunos valores de referencia relacionados.

Se puede apreciar que los valores son similares entre sí, variando en un rango relativamente estrecho, desde 26 hasta 333 ng g<sup>-1</sup>, aunque con variaciones significativas a lo largo del periodo de estudio. Los contenidos de Hg total para el olivo 1 son en promedio de 155 ng g<sup>-1</sup>, en un rango entre 46 y 333 ng g<sup>-1</sup>; para el olivo 2 el promedio fue de 168 ng g<sup>-1</sup>, con un rango entre 26 y 320 ng g<sup>-1</sup>, y para el olivo 3, se obtuvieron los valores más bajos, con un promedio de 110 ng g<sup>-1</sup> y un rango entre 55 y 195 ng g<sup>-1</sup>.

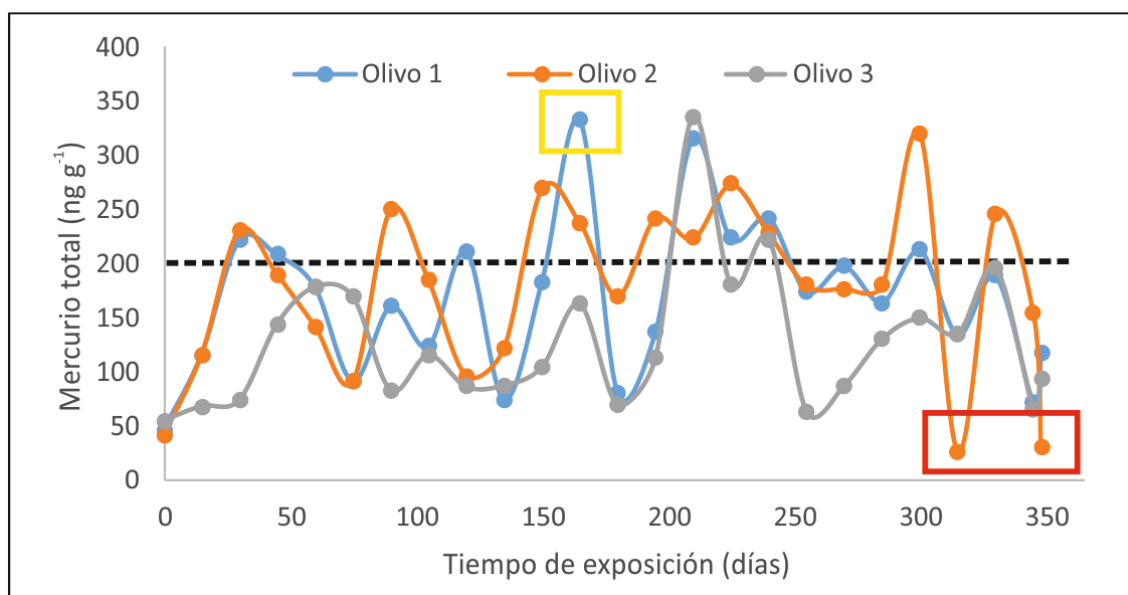
Muestras	T (días)	Fecha	Olivo 1	Olivo 2	Olivo 3	$\bar{X}$	Referencia
0	0	08/07/15	46	41	55	47	Este estudio.
1	15	23/07/15	116	116	68	100	Este estudio.
2	30	07/08/15	222	231	74	176	Este estudio.
3	45	22/08/15	208	190	144	181	Este estudio.
4	60	07/09/15	178	142	178	166	Este estudio.
5	75	22/09/15	91	91	169	117	Este estudio.
6	90	08/10/15	160	250	83	164	Este estudio.
7	105	22/10/15	123	185	115	141	Este estudio.
8	120	06/11/15	211	96	86	131	Este estudio.
9	135	23/11/15	74	122	87	94	Este estudio.
10	150	10/12/15	183	269	104	185	Este estudio.
11	165	22/12/15	333	238	162	244	Este estudio.
12	180	11/01/16	80	170	69	106	Este estudio.
13	195	22/01/16	136	242	112	163	Este estudio.
14	210	05/02/16	316	223	335	291	Este estudio.
15	225	23/02/16	223	273	180	225	Este estudio.
16	240	08/10/16	242	228	222	230	Este estudio.
17	255	22/03/16	174	180	63	139	Este estudio.
18	270	07/04/16	197	177	87	154	Este estudio.
19	285	21/04/16	164	180	130	158	Este estudio.
20	300	05/05/16	212	320	149	227	Este estudio.
21	315	23/05/16	134	26	135	98	Este estudio.
22	330	06/06/16	188	246	195	210	Este estudio.
23	345	20/06/16	71	154	65	97	Este estudio.
24	348	23/06/16	117	29	94	73	Este estudio.
□			155	168	110	144	Este estudio.
DE			65	80	43		Este estudio.
Mínimo			46	26	55		Este estudio.
Máximo			333	320	195		Este estudio.
Área no contaminada						20-180	Bargagli (1995)
Límite para uso agrícola						200	Kabata-Pendias (2010)
Flix						481	Esbrí et al. (2015)
Jódar						161	Higueras et al. (2016a)
Almadén						1213	Higueras et al. (2012b)

**Tabla 2:** Valores de mercurio total en hojas de olivo (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el desarrollo del experimento en Almadenejos, comparados con algunos valores de referencia.

Abreviaturas: T: tiempo de exposición; DE: desviación standard.

Comparados estos promedios con los valores descritos por Bargagli (1995) en un área de Italia no contaminada (tabla 2), observamos que buena parte de los valores se encuentran dentro del mismo rango ( $20\text{--}180\text{ ng g}^{-1}$ ). No obstante, existen una cantidad de valores que sobrepasan estos valores de fondo, en concreto, un 30,7% de los datos exceden este valor de zona no contaminada. Para valorar mejor este dato, debemos de tener en cuenta que los olivos comenzaron su tiempo de exposición desde una condición libre de mercurio, tanto en el suelo como en el agua de riego o el aire, por lo que el efecto de la exposición al MGT en Almadenejos ha mostrado capacidad de toxificar la planta en menos de un año, dado que se supera el límite para uso agrícola de  $200\text{ ng g}^{-1}$  (Kabata-Pendias, 2010). De hecho, observando la figura 19 es destacable el hecho de que, pasados 30 días, dos de los olivos ya hubieran superado este límite para cultivos agrícolas. También se observa que el otro olivo necesitó 210 días para alcanzar este valor límite, un dato que expresa bien la variabilidad que individuos de la misma especie muestran en el proceso de captación de Hg atmosférico.

La tabla 1 también permite realizar una comparación de estos valores de Hg en hojas en nuestro experimento *in situ* con los contenidos en condiciones ambientales reales en tres zonas contaminadas por Hg. Esta comparación ofrece el dato interesante de que los promedios de los datos de nuestro experimento son mucho menores que los ofrecidos por Higuera et al. (2016a) de una zona contaminada por una planta cloroacústica activa (Flix) y los del distrito minero de Almadén, pero similares a los registrados en un área con una planta cloroacústica clausurada 30 años antes (Jódar). Estas semejanzas y disimilitudes pueden deberse tanto al breve periodo de exposición de los olivos del experimento (solo 11 meses, frente a una exposición permanente o “crónica” de los otros olivos), como a la naturaleza de la fuente de emisión, activa en las áreas que muestran valores de Hg en hoja más elevados, y ya clausurada en las zonas con contenidos más bajos, Jódar y nuestro experimento.



**Figura 19:** Gráfico temporal de la concentración de mercurio en hojas de olivos en Almadenejos. Recuadro rojo: días donde las hojas presentan muy poco mercurio por haberlo emitido previamente. Recuadro amarillo: días donde los olivos muestran la mayor cantidad de captación. En línea discontinua aparece señalado el límite de toxicación de la planta (Kabata-Pendias, 2010).

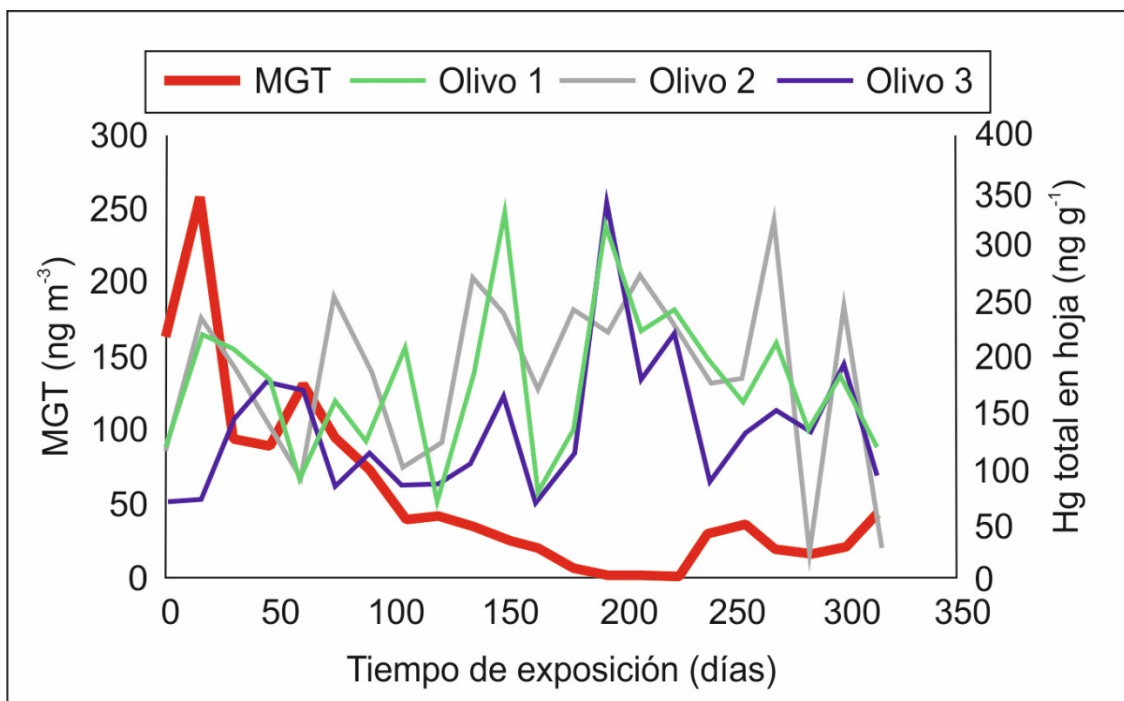
Observando los datos en términos de variación temporal (figura 19), resulta evidente la alta variabilidad de los contenidos en mercurio en las hojas durante el periodo de experimentación, con contenidos de mercurio total en hoja oscilando entre 50 y 300 ng g<sup>-1</sup> durante gran parte del periodo del estudio. Dado que partimos de la premisa de que el mercurio captado por las hojas de olivo proviene del mercurio gaseoso presente en la atmósfera, y que la vía de entrada a la hoja es el sistema estomático y el ciclo de fotosíntesis de la planta, podemos deducir que esta altísima variabilidad de mercurio en hoja puede relacionarse con la variabilidad en términos de contenido de mercurio en la atmósfera en la zona de exposición. Esta relación entre las variaciones de mercurio en las hojas y las variaciones de MGT en la atmósfera del experimento será estudiada más adelante (apartado 3.3). Hasta este momento podemos afirmar que estos datos sugieren que las hojas van acumulando y emitiendo alternativamente el Hg atmosférico debido a la variabilidad atmosférica en términos de MGT que existe en Almadenejos, aunque es posible que haya más factores involucrados en el proceso, como las variables climatológicas y fisiológicas que afecten a la disponibilidad de la planta para captar o reemitir el mercurio disponible en la atmósfera. Esto puede observarse en los días en los que las hojas presentan muy poco mercurio por haberlo emitido previamente, como se puede apreciar en el Olivo 2 entre mayo y junio de 2016 (señalado con cuadro de color rojo en la figura 19). También se observan, en la misma figura, días en donde los olivos muestran la mayor cantidad de captación, como es el caso del olivo 1 en el mes de diciembre de 2015 (señalado con cuadro amarillo en la figura 19). El comportamiento de cada planta mostró una variabilidad elevada, a pesar de que las plantas se colocaron una junto a la otra a una distancia menor de 10 centímetros, lo que permite suponer unas condiciones similares de exposición a MGT, e induce a pensar que diferencias en la fisiología de cada individuo pudieran estar influyendo en el proceso.

Los niveles de MGT que se registraron en Almadenejos durante el experimento (figura 20), mostraron una evolución diferente a la figura 19, llegando a alcanzar en verano niveles por encima de 250 ng m<sup>-3</sup>, mientras que durante el otoño y el invierno fue disminuyendo esta concentración, llegando a unos niveles de 4 ng m<sup>-3</sup>. A partir del 22 de enero de 2016 hasta primavera-verano, la concentración de mercurio fue creciendo, llegando a los 51 ng m<sup>-3</sup>. Es destacable la ausencia de correlación en cuanto a tendencias entre MGT y mercurio en hoja, sobre todo en el periodo de invierno, durante el cual los valores promedio de MGT fueron mínimos, mientras que los valores de mercurio en hoja fueron máximos. Existen varios factores a considerar para entender este hecho:

Climatología, desfavorable en verano para que la planta tenga abiertos los estomas un tiempo suficiente que permita el intercambio de gases. Las temperaturas altas del verano y parte de la primavera y el otoño someten a las plantas a un estrés hídrico del que se protegen limitando la apertura de los estomas y los ciclos de respiración. Si analizamos este factor por parámetros, encontramos que (como se muestra en la figura 21) los parámetros que muestran valores más altos en invierno coincidentes con los valores altos de mercurio en hoja son humedad relativa, presión atmosférica y velocidad de viento. De estos tres parámetros, solo la humedad relativa puede estar relacionado con el proceso de intercambio de gases de la planta a través de los estomas, puesto que este intercambio es fundamentalmente de agua. Sin embargo, la temperatura, el punto de rocío y la radiación solar muestran una evolución contraria a la del contenido de mercurio total en hoja.

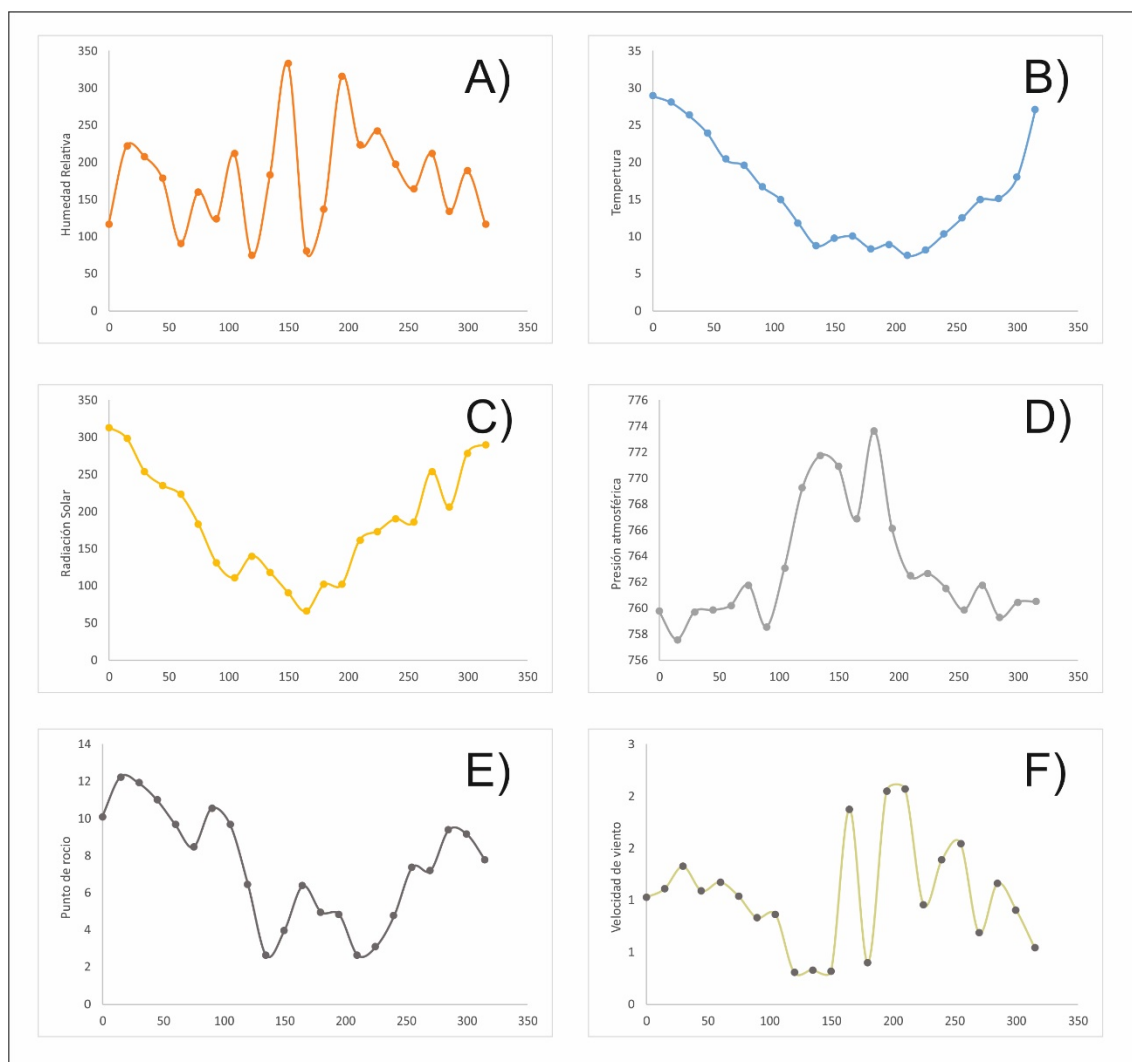
La fisiología de la planta se ve afectada según la época del año, ya que, en invierno, cuando existen temperaturas inferiores a 10°C, se produce la deshidratación relativa en el olivo (Pavel y Fereres, 1998). Sin embargo, la exposición a temperaturas frías durante el invierno es importante para la brotación de las flores. Lo mismo sucede con la absorción de mercurio: se observa más acumulación de mercurio en las hojas durante el invierno, ya que está mejor adaptado al clima frío, y en primavera-verano al empezar a subir las temperaturas la planta se siente más estresada y existe menos captación de mercurio en las hojas.

La dinámica de la fuente de emisión, que en el caso de este experimento consiste en un antiguo cerco metalúrgico con elevados contenidos en mercurio total y mercurio orgánico en el suelo. Llanos et al. (2011) describieron los compuestos de mercurio que más eficazmente emiten mercurio gaseoso en un suelo, y que serían aquellos compuestos más solubles, fundamentalmente sales (cloruros, sulfatos...) que se encuentran en el suelo. El ciclo de formación de estos compuestos solubles implica la presencia de una importante cantidad de agua libre en la estructura del suelo. Aunque no se dispone de datos de humedad de suelo durante este experimento, es esperable que el ciclo de humectación alcance máximos valores en invierno y mínimos en verano, como describe Llanos (2011) para la cercana localización de la mina de Las Cuevas. La evolución de la humedad del suelo es, así pues, similar o coincidente con los máximos invernales de mercurio en hoja. Hay que tener en cuenta que gran parte del mercurio emitido por los compuestos solubles queda atrapado en el suelo y muy probablemente sea emitido en su máxima proporción con las primeras lluvias del otoño o la primavera, lo que puede invalidar la relación causa-efecto de estos dos fenómenos coincidentes en el tiempo.



**Figura 20:** Evolución del MGT en la estación depuradora de Almadenejos en comparación con la evolución del Hg total en la hoja de los olivos.

Un hecho que se deduce con facilidad al observar la figura 19 es que las hojas parecen estar captando y reemitiendo a la atmósfera el mercurio en función (o no) de la concentración de éste en el medio, en un proceso de intercambio continuo de mercurio gaseoso entre la hoja y la atmósfera. Para esclarecer estas relaciones entre los contenidos de mercurio en las hojas de olivo, el MGT y los parámetros micrometeorológicos se ha realizado una matriz de correlación (tabla 3).



**Figura 21:** Evolución de los principales parámetros micrometeorológicos durante el periodo de exposición de los olivos en Almadenejos. A) humedad relativa (%); B) temperatura (°C); C) radiación solar (W m<sup>-2</sup>); D) presión atmosférica (atm); E) punto de rocío (°C); F) velocidad de viento (m s<sup>-1</sup>).

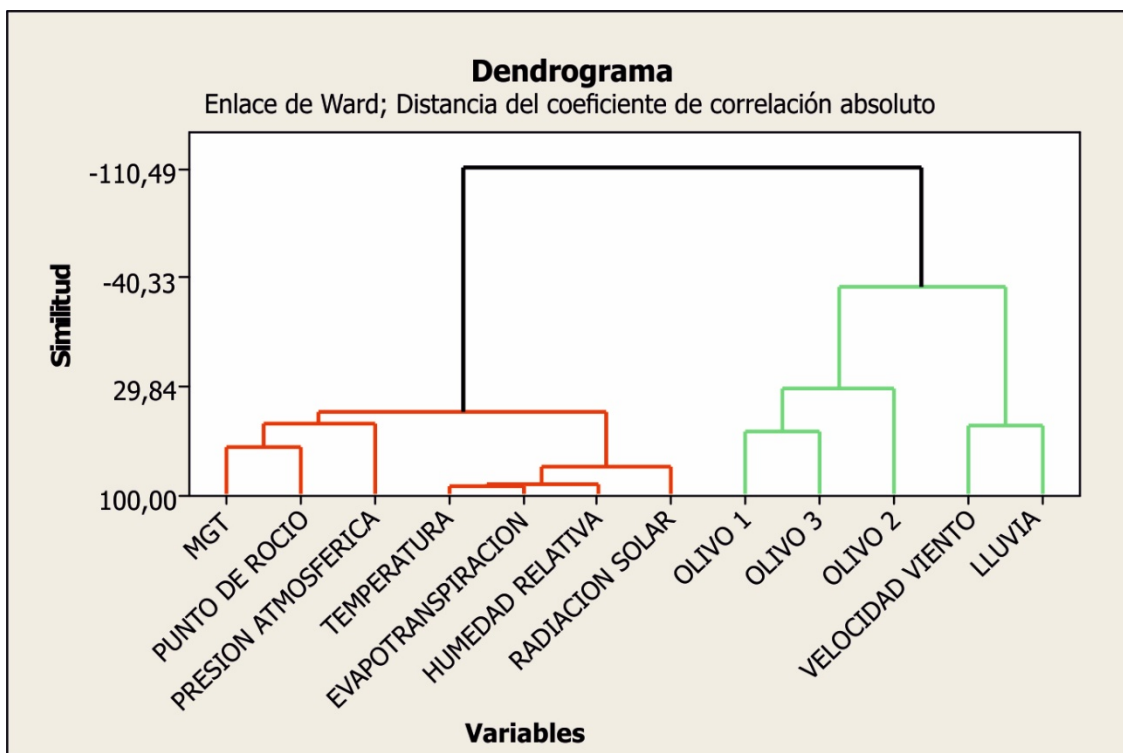
Este estudio de correlaciones no proporcionó pistas sobre la influencia de MGT y factores meteorológicos sobre la absorción de mercurio por las hojas de olivo. Hay que destacar que en la matriz de correlación no se observan correlaciones significativas entre los contenidos de mercurio en las hojas de los olivos y ningún parámetro meteorológico o de contenidos de MGT en la atmósfera. Incluso entre los mismos individuos de la misma especie y expuestos al mercurio atmosférico uno junto al otro, no se han encontrado correlaciones más elevadas del 0,5, lo que expresa la considerable variabilidad de los individuos de la misma especie en el experimento. Sin embargo, sí se puede ver cierta relación entre el MGT y algunos parámetros

meteorológicos, como ya han sugerido Esbrí et al. (2016) y Martínez-Coronado et al. (2016) para el caso de Almadén y Puertollano. Otros parámetros meteorológicos aparecen relacionados entre sí, con el caso más evidente de la temperatura y la humedad relativa, que alcanza un  $R^2$  de 0,8.

	Olivo 1	Olivo 2	Olivo 3	MGT M	MGT D	Temp.	Hum.	PR	VV	PA	Pp	RS	R.UV
Olivo 2	0,51												
Olivo 3	0,59	0,26											
MGT.M	-0,01	-0,15	-0,38										
MGT.D	-0,23	-0,16	-0,42	<b>0,98</b>									
Temp.	-0,26	-0,39	-0,30	<b>0,78</b>	<b>0,73</b>								
Hum.	0,17	0,29	0,25	<b>-0,72</b>	-0,66	<b>-0,95</b>							
PR	-0,32	-0,42	-0,03	<b>0,70</b>	0,67	<b>0,84</b>	-0,6						
VV	0,14	0,03	0,36	-0,04	-0,09	-0,09	0,15	0,01					
PA	0,12	0,31	0,03	-0,48	-0,42	-0,65	0,56	-0,69	-0,37				
Pp	0,05	-0,17	0,16	-0,37	-0,36	-0,44	0,56	-0,15	0,56	-0,21			
RS	-0,15	-0,19	-0,12	0,57	0,5	<b>0,81</b>	<b>-0,80</b>	0,58	-0,04	<b>-0,77</b>	-0,35		
R.UV	-0,11	-0,17	-0,05	0,51	0,43	<b>0,76</b>	<b>-0,80</b>	0,58	0,02	<b>-0,72</b>	-0,24	<b>0,98</b>	
ET	-0,23	-0,3	-0,26	<b>0,72</b>	0,66	<b>0,90</b>	<b>-0,90</b>	<b>0,74</b>	-0,08	<b>-0,77</b>	-0,43	<b>0,93</b>	<b>0,9</b>

**Tabla 3:** Coeficientes de correlación de Pearson para todos los parámetros en experimentos de absorción en Almadenejos. Abreviaturas: PA: Presión atmosférica, VV: velocidad del viento, RS: radiación solar, PR: punto de rocío, R.UV: radiación ultravioleta, MGT M: mercurio gaseoso total en atmósfera (promedio), MGT D: mercurio gaseoso total en atmósfera (sumatorio diario), Pp: precipitaciones; Temp: temperatura ambiente, Hum: humedad relativa.

Una vez ensayada sin éxito la correlación entre parejas de datos, se realizó un análisis multivariante basado también en el grado de correlación entre grupos de datos. El dendrograma resultante (figura 22) muestra que los contenidos de mercurio en olivos aparecen en un grupo aislado del resto de los parámetros considerados en el estudio, a excepción de la velocidad de viento y la sumatoria de lluvia, que aparecen muy débilmente relacionados (similitudes negativas en el dendrograma). El otro grupo de parámetros incluyen el MGT junto al punto de rocío y la presión atmosférica, dos parámetros ya descritos como muy relacionados con anterioridad (Esbrí et al., 2016).



**Figura 22:** Dendrograma de variables del experimento de Almadenejos.

Se realizó un balance de masas para el olivo 2 (ya que fue el único olivo que superó todo el periodo de muestreo manteniendo su vitalidad y una cantidad de hojas considerable), usando los pesos iniciales y finales en húmedo de todas las partes de la planta de olivo (suelo, raíces, tallos y hojas) y las concentraciones de mercurio en pesos secos.

Se obtuvo el factor de conversión entre los pesos húmedo y seco. De los datos obtenidos es necesario destacar que el ejemplar de olivo estudiado tenía inicialmente una cantidad total de mercurio de 1416 ng, con un máximo de 11.056 ng alcanzado en mayo de 2016, mientras que retuvo 1002 ng al final del experimento. Todos estos valores suponen que la biomasa del olivo no cambió desde el inicio hasta el final del experimento.

Si restringimos el balance de masas al período comprendido entre el comienzo y el día que absorbió la máxima cantidad de mercurio, el aumento neto fue del 680% del mercurio inicial, lo que demuestra la alta capacidad de bioacumulación de las hojas cuando el mercurio está disponible en altas concentraciones en la atmósfera.

El saldo neto desde el principio hasta el final del experimento fue una pérdida de 414 ng durante un ciclo anual completo de absorción y desorción.

A la vista de los resultados obtenidos, vemos como en una zona donde existen altas concentraciones de mercurio atmosférico, las plantas son capaces de captar dicho elemento. Se observó que individuos de la misma especie, edad e incluso colocados a una distancia menor de 10 cm entre ellos, obtuvieron diferentes concentraciones de mercurio en hoja.

También resultó evidente la variabilidad de los contenidos de mercurio en las hojas durante el experimento, independientemente de la cantidad de mercurio que existiera en ese momento



en la zona, ya que observamos como en el olivo 1 se registran los máximos niveles de mercurio en diciembre (figura 19) mientras que los niveles máximos de MGT en la zona se concentran en verano (figura 20) y en diciembre son mínimos.

Para resolver esta discrepancia entre la evolución de los dos parámetros se pueden tener en consideración varios factores, uno de ellos la climatología. Si tenemos en cuenta que las temperaturas altas de primavera-verano conducen a la planta a un estrés hídrico, en esa época se produciría menos captación de mercurio por parte de las hojas. El ciclo de los compuestos orgánicos hallados en los suelos del cerco metalúrgico (fuente de emisión del mercurio) implica una importante cantidad de agua en la estructura del suelo, aunque no existen datos de la humedad del suelo, es esperable que este ciclo alcance los valores máximos en inviernos haciendo coincidir estos máximos con los máximos obtenidos de mercurio en hoja.

Se ha observado que existe una cierta relación entre el MGT y algunos parámetros micrometeorológicos como ya sugirieron Esbrí et al. (2016) y Martínez-Coronado et al. (2016) para los casos de Almadén y Puertollano. Además, también se ha encontrado relación entre la temperatura y la humedad relativa.

Se realizó un análisis multivariante (figura 22) en el cual se muestra que la concentración de mercurio en los olivos aparece aislada del resto de parámetros, excepto de la velocidad del viento y de la lluvia, mientras que por otro lado se encuentran el MGT con el punto de rocío y presión atmosférica.

A lo largo de los últimos años, muchos investigadores han centrado su atención en la caracterización de la dinámica de mercurio en el sistema suelo-planta-atmósfera. Ahammad et al. (2018) y Liu et al. (2017) apoyan la idea de que la absorción de mercurio de los suelos puede ocurrir a través de las raíces o a través de las hojas, promoviendo la creencia de que estas dos rutas son preferenciales, mientras que por su parte Esbrí et al. (2018), Zheng et al. (2017), Barquero et al. (2017), Kowalski y Frankowski (2016) y Assad et al. (2016) consideran sólo la absorción mediante la ruta aérea. Cuando el mercurio es el elemento de estudio en el sistema suelo-planta-atmósfera, este estudio es complicado. En muchos casos, el mercurio está presente en el suelo como compuestos no disponibles o la fracción disponible es un componente menor (Higueras et al., 2015; Campos et al., 2018), pero su capacidad de emisión sigue siendo alta (p. ej., cinabrio o mercurio elemental) y como consecuencia, los niveles de MGT son elevados. Este hecho dificulta la interpretación de la evolución de los contenidos de mercurio total en la hoja.

Todos los factores en el sistema suelo-planta-atmósfera implican la necesidad de un conocimiento no sólo de los datos de mercurio en suelos, plantas y atmósfera, sino también de los datos de especiación de mercurio, datos de estrés de la planta, datos micrometeorológicos y otros, además de que estos parámetros estén relacionados unos con otros.

Otro factor para considerar es el papel jugado por el intercambio de otros gases preferenciales en el ciclo de fotosíntesis de la planta. Stamenkovic y Gustin (2009) confinaron *Rudbeckia hirta*, *Sorghastrum nutans*, *Andropogon gerardii*, y *Populus tremuloides* para monitorizar el intercambio de gases y midieron mercurio y CO<sub>2</sub> en condiciones de luz y oscuridad bajo condiciones de 25% de humedad relativa. Descubrieron que los altos niveles de mercurio en la

atmósfera aumentaban la deposición de mercurio en hoja, produciéndose en condiciones tanto de luz como de oscuridad cuando los estomas están cerrados. Rao y Dubey (1992) describieron que la captación depende de la densidad de los tricomas, que es extremadamente alta en el caso de hojas de olivo.

Las conclusiones preliminares de este apartado pueden resumirse en:

El experimento aquí descrito y discutido se refiere a exposición *in situ* a mercurio gaseoso con plantas comunes (olivos) ubicados en lugares contaminados como Almadenejos (Ciudad Real).

El mercurio que pueden obtener y acumular en las hojas las plantas de olivo varía según las condiciones atmosféricas y la abundancia de mercurio.

Distintos individuos presentan distintas capacidades de captación de mercurio bajo similares condiciones externas.

El intercambio de mercurio gaseoso a través de las hojas es continuo y dependiente del contenido de mercurio en la atmósfera en la que está la planta.

Estos hallazgos tienen implicaciones para el uso de plantas como bioindicadores o para fines de fitorremediación. Un intercambio continuo en la interfase hoja-atmósfera de la planta implica que los contenidos de mercurio en la hoja no pueden considerarse únicamente como el resultado de un largo período de exposición al mercurio atmosférico. Este hecho representa una limitación para una de las principales ventajas de la biomonitorización, a saber, obtener información sobre la presencia de contaminantes durante largos períodos utilizando solo medidas individuales. Además, la capacidad de las plantas para intercambio de mercurio con la atmósfera implica que el mercurio que incorpora durante un periodo determinado puede ser reemitido en la atmósfera, y no fijado en la planta, incumpliendo el objetivo básico de la fitorremediación. Además, es necesario tener en cuenta la monitorización de MGT en todos los estudios dirigido a evaluar el sistema suelo-planta cuando hay mercurio presente.

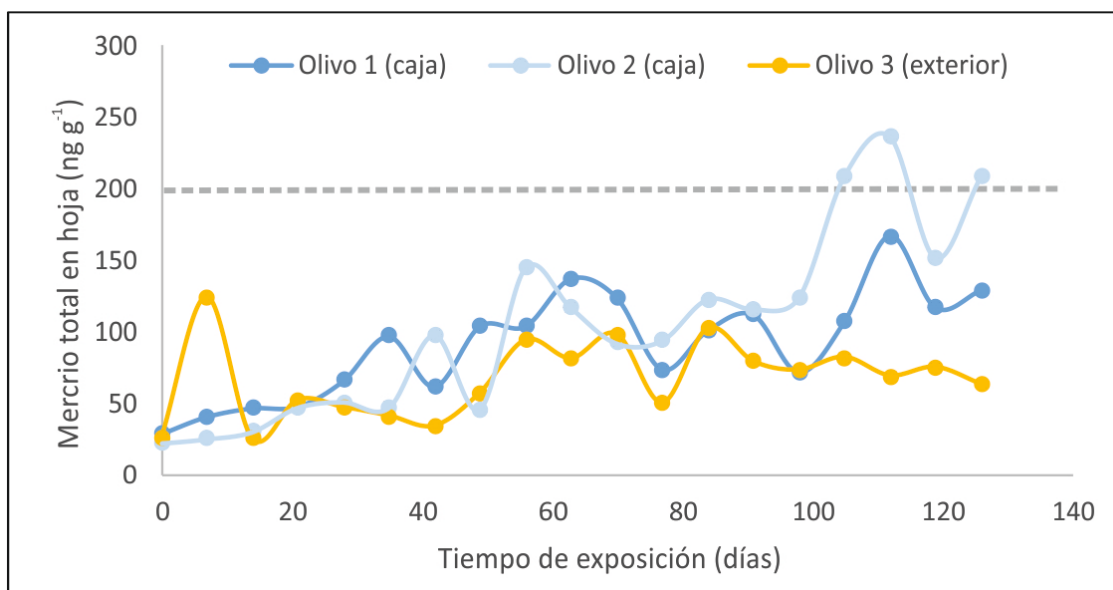
### **3.2. Segundo experimento: situación experimental en ambiente confinado (suelo-planta-atmósfera)**

Este experimento se diseñó para estudiar la acumulación de mercurio por absorción radicular, y se realizó en Almadén, concretamente en el Laboratorio de Biogeoquímica de Metales Pesados del Instituto de Geología Aplicada en la Escuela de Ingeniería Minera e Industrial (descrito en el apartado de materiales y métodos).

Muestra	T (días)	Fecha	Olivo 1 en caja	Olivo 2 en caja	Olivo exterior	$\bar{X}$	Referencia
0	0	29/10/15	29	22	25	25	Este trabajo
1	7	05/11/15	41	25	124	63	Este trabajo
2	14	12/11/15	47	30	25	34	Este trabajo
3	21	19/11/15	48	47	52	49	Este trabajo
4	28	26/11/15	66	51	47	55	Este trabajo
5	35	03/12/15	97	47	41	62	Este trabajo
6	42	10/12/15	62	98	34	65	Este trabajo
7	49	18/12/15	104	46	57	69	Este trabajo
8	56	24/12/15	104	145	94	114	Este trabajo
9	63	01/01/16	137	117	81	112	Este trabajo
10	70	08/01/16	124	92	98	105	Este trabajo
11	77	14/01/16	74	94	50	73	Este trabajo
12	84	21/01/16	101	123	102	109	Este trabajo
13	91	17/03/16	112	116	79	102	Este trabajo
14	98	25/03/16	72	124	73	90	Este trabajo
15	105	21/04/16	107	209	82	133	Este trabajo
16	112	28/04/16	167	237	69	158	Este trabajo
17	119	05/05/16	117	152	75	115	Este trabajo
18	126	18/05/16	129	209	63	134	Este trabajo
□			91	104	67	88	Este trabajo
SD			37	65	27		Este trabajo
Mínimo			29	22	25		Este trabajo
Máximo			167	237	124		Este trabajo
Área no contaminada						20-180	Bargagli (1995)
Límite para uso agrícola						200	Kabata- Pendias (2010)
Flix						481	Esbri et al. (2014)
Jódar						161	Higuera et al (2016a)
Almadén						1213	Higuera et al. (2012b)

**Tabla 4:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento, junto con las principales referencias.

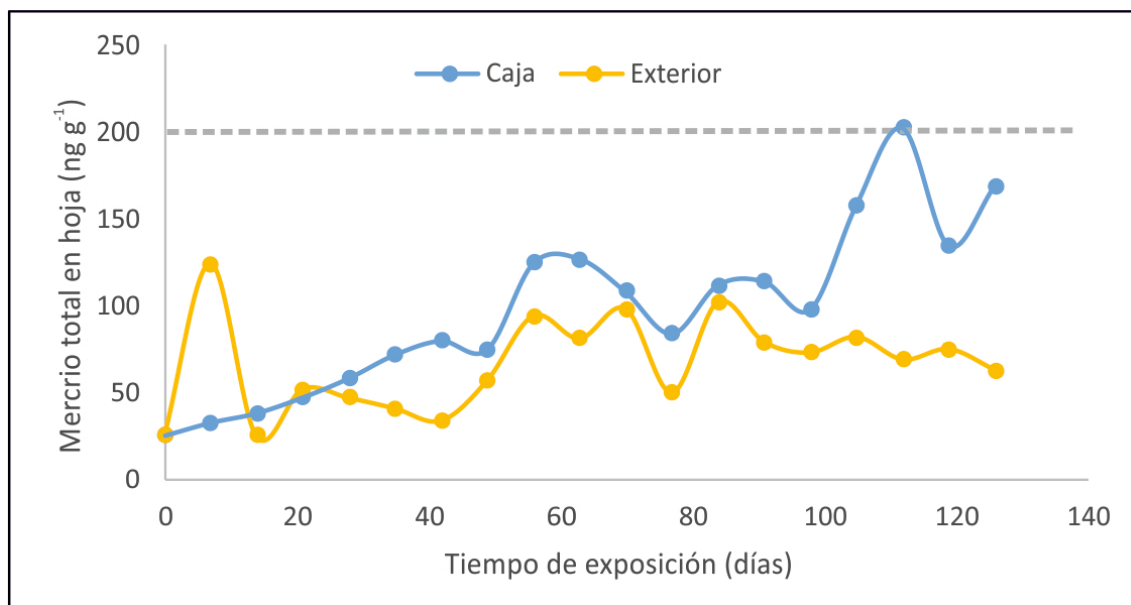
Como síntesis, en las hojas de los dos olivos que se mantuvieron dentro de la caja se obtuvieron valores promedio de 91 y 104  $\text{ng g}^{-1}$ , con mínimos de 29 y 22  $\text{ng g}^{-1}$ , y máximos de 167 y 237  $\text{ng g}^{-1}$ , mientras que en las del olivo situado fuera de la caja, el promedio fue de 67  $\text{ng g}^{-1}$ , con un rango de valores entre 25 y 124  $\text{ng g}^{-1}$ .



**Figura 23:** Comparación entre los olivos confinados en la caja de policarbonato y el olivo expuesto al mercurio ambiental de Almadén.

Como resultado de la experimentación se pudo observar que, por efecto del riego con mercurio, éste pasaba a forma gaseosa de forma directa y se concentraba dentro de la caja de policarbonato en forma de mercurio gaseoso. Este defecto en el desarrollo del experimento lo desvirtuó, ya que se pretendía observar si existía una captación que se pudiera atribuir exclusivamente a captación radicular. Por otra parte, y a pesar de que todos los ejemplares se regaron con agua con concentraciones similares de mercurio en disolución, se pudo observar que las hojas de las plantas que se encontraban dentro de la caja captaban más mercurio que las hojas situadas fuera de la caja, a pesar de que las hojas que se situaban fuera de la caja estaban sometidas al mercurio atmosférico de Almadén.

Comparados estos promedios con los valores obtenidos en el primer experimento, podemos observar que, aunque los olivos se encuentren dentro de la caja de policarbonato y sean regados con mercurio, son capaces de captar este elemento del ambiente (hay que recordar que el mercurio del agua de riego puede pasar a forma gaseosa, expandiéndose por toda la caja de policarbonato) y así las hojas lo captan llegando a obtener valores incluso similares a los que se obtuvieron en los olivos expuestos a las altas concentraciones de mercurio atmosférico de Almadenejos. Por esta razón, no se ha podido confirmar ni desmentir la idea inicial de si el mercurio podía ser captado por vía radicular, aportándolo en el agua de riego. En todo caso, el riego con agua con ciertas concentraciones de mercurio no ha supuesto un incremento de la concentración en las hojas respecto a los regados con agua libre de mercurio en Almadenejos (primer experimento, apartado 2.1).

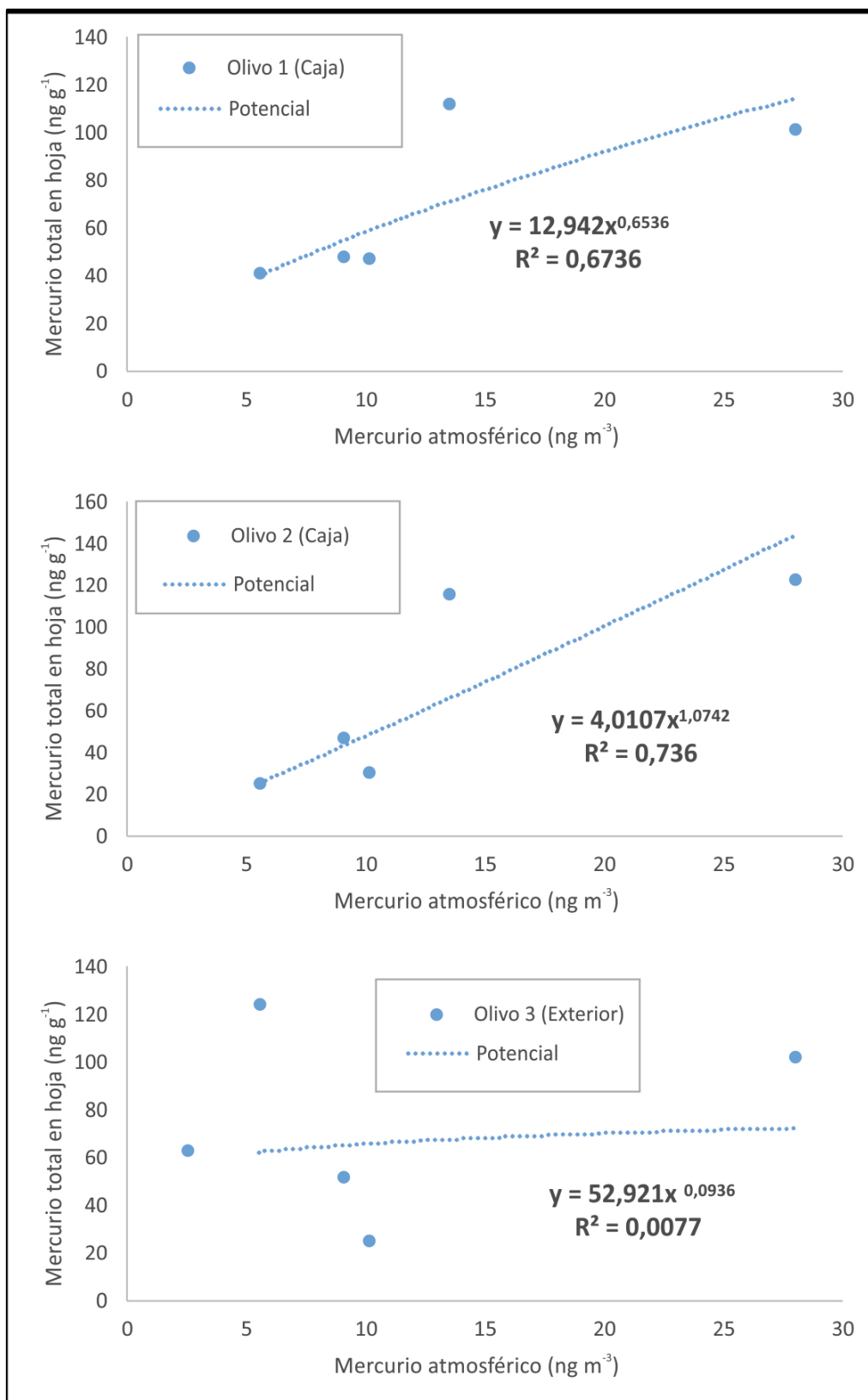


**Figura 24:** Comparación entre el promedio de los dos olivos confinados en la caja de policarbonato y el olivo expuesto al mercurio ambiental de Almadén.

Comparando los datos con los descritos por Bargagli (1995) en un área de Italia no contaminada, observamos que los valores de concentración de mercurio en las hojas se encuentran dentro del mismo rango (20-180 ng g<sup>-1</sup>), como se puede observar en la tabla 4. No obstante, observando los valores de máximos, éstos no sobrepasan el valor de fondo, salvo en el caso de uno de los olivos que se encontraban dentro de la caja, que alcanzó un valor de 237 ng g<sup>-1</sup>.

La figura 23 muestra la evolución temporal de las concentraciones de mercurio medidas en las hojas de los tres ejemplares empleados en este experimento. De acuerdo con estos datos, observamos, como en el experimento anterior, altas variaciones temporales, si bien los olivos que se encontraban dentro de la caja muestran valores en un rango más estrecho, mientras que el olivo que se encontraba fuera, expuesto a la meteorología y a la situación del entorno, tiene valores más variables respecto de los otros dos y por lo general más bajos. Son destacables las similitudes en términos de tendencia o evolución de los dos valores de mercurio en hoja (dentro y fuera de la caja, figura 24). Si partimos de la idea de que el mercurio captado por las hojas de los olivos confinados en el interior de la caja procedía del agua de riego, y el mercurio captado por las hojas de olivo en el exterior de la caja provenía de emisiones difusas en el exterior de la ciudad de Almadén, debe de haber factores externos a esta discrepancia en el origen del mercurio que explique la similitud de los dos datos, al menos en lo que respecta a la evolución de las concentraciones.

En lo que respecta a la toxificación de las plantas en función del límite establecido por Kabata-Pendias (2010) de 200 ng g<sup>-1</sup>, ninguna de las plantas del estudio llega a superarlo, a pesar de haber estado siendo regadas con mercurio en la solución nutritiva y haber estado expuestas además al MGT dentro y fuera de la caja de policarbonato.



**Figura 25:** Gráfico de correlación entre el mercurio atmosférico y el mercurio en hoja.

Si observamos la figura 25, vemos que existe correlación entre el mercurio captado en las hojas de los olivos que se encuentran dentro de la caja de policarbonato y el mercurio

atmosférico, mientras que la correlación entre el mercurio atmosférico y el olivo que se sitúa en el exterior no aparece.

El experimento presentado en este apartado de la presente Tesis ha tratado de estudiar la acumulación de mercurio por absorción radicular; para ello se diseñó un cajón de policarbonato, donde se introdujeron 2 olivos libres de mercurio, mientras que un tercero se dejó expuesto a la situación del entorno; los tres olivos eran regados cada semana con una solución conteniendo nitrato de mercurio. La evolución del contenido de mercurio en las hojas muestra la interfase planta-atmósfera, como se ha podido observar, ya que los olivos ubicados dentro de la caja de policarbonato tienen más cantidad de mercurio; esto se debe a que el mercurio regado pasa a forma gaseosa, acumulándose en la caja hasta llegar a ser absorbido y acumulado por la planta en sus hojas.

Al observar los resultados obtenidos en este experimento, seguimos manteniendo la idea de que el mercurio captado por las hojas de los olivos se realiza por vía aérea. Como se ha podido observar en este segundo experimento, aunque los olivos se rieguen con la misma cantidad de mercurio, los que se encuentran dentro de la caja de policarbonato obtienen mayor cantidad de mercurio. Esto es debido a que dicho mercurio pasa a forma gaseosa, acumulándose en la caja hasta llegar a ser absorbido por la planta a través de las hojas, mientras que el olivo que se sitúa fuera de la caja de policarbonato obtiene una cantidad menor de mercurio, ya que en la zona existía poco mercurio atmosférico durante el desarrollo del experimento. Lamentablemente no se ha podido confirmar ni desmentir la posibilidad de que parte de ese mercurio captado por la planta sea por absorción radicular, al no haber podido evitar la emisión de mercurio gaseoso del agua de riego.

El trabajo aquí expuesto se refiere a la experimentación in situ con plantas comunes (olivos) ubicados en una zona alejada fuera de los focos activos de emisión de mercurio de Almadén, donde dos de estas plantas estaban ubicadas en un cajón de policarbonato mientras que una tercera planta se dejó expuesta a la situación del entorno. Las conclusiones preliminares de este apartado de la tesis fueron las siguientes:

El mercurio que pueden obtener las plantas de olivo varía según las condiciones atmosféricas de mercurio a las que se sometan.

Distintos ejemplares presentan distintas tasas de absorción de mercurio bajo similares condiciones externas.

El intercambio de mercurio gaseoso a través de las hojas es continuo y dependiente del contenido de mercurio en la atmósfera en la que está la planta.

Es destacable la variabilidad observada en individuos de la misma especie, con similar cantidad de biomasa y sometidos estrictamente a las mismas condiciones ambientales, tanto en términos de MGT como de nutrientes y mercurio en la solución de riego, así como parámetros micrometeorológicos.

### 3.3. Tercer experimento: captación de mercurio en cultivos: alternativa entre la captación suelo-planta-atmósfera.

A la vista de los resultados de los experimentos anteriores, este experimento se diseñó para intentar confirmar, desmentir o matizar la idea de que el mercurio se capta preferentemente (o exclusivamente) por las hojas, frente a la posibilidad de captación por vía radicular, preestablecida en estudios previos. Para ello se eligieron tres zonas de estudio (Almadenejos, Ciudad Real y Puertollano), para tener ambientes controlados de captación del mercurio en condiciones de distintas concentraciones atmosféricas. Para poder evaluar la entrada de mercurio en la planta a través de las raíces, se añadió en todos los experimentos mercurio en solución en el agua de riego.

Los resultados de las distintas partes de este experimento se describen a continuación:

Las tablas 5 y 6 muestran los resultados analíticos obtenidos en el experimento que incluía mercurio en la atmósfera como una variable más.

Los resultados obtenidos en Almadenejos, habiéndose analizado 600 muestreos de olivos y 48 muestreos de vid, han permitido obtener los siguientes datos a valorar:

En las hojas viejas de olivo que permanecieron en Almadenejos, expuestas al MGT, se obtuvo un promedio de  $181 \text{ ng g}^{-1}$ , con un valor máximo de  $573 \text{ ng g}^{-1}$ , y un valor mínimo de  $74 \text{ ng g}^{-1}$ ; mientras que las hojas jóvenes mostraron un valor promedio de  $68 \text{ ng g}^{-1}$ , con un valor máximo de  $340 \text{ ng g}^{-1}$  y un valor mínimo de  $11 \text{ ng g}^{-1}$ .

	MUESTREOS									
Hg Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	103	124	80	79	212	108	196	259	254	222
5	83	83	98	136	568	105	109	152	271	185
50	74	115	86	184	573	123	166	204	279	212
500	84	115	87	136	143	410	154	212	289	176

**Tabla 5:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas viejas de olivos en Almadenejos, según los nueve muestreos que se realizaron.



MUESTREOS										
Hg Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	22	22	39	19	164	36	47	142	101	28
5	26	11	23	27	201	45	29	87	111	46
50	28	25	28	58	100	36	29	119	32	50
500	23	32	23	76	68	28	48	56	280	340

**Tabla 6:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas jóvenes de olivos en Almadenejos, según los nueve muestreos que se realizaron.

Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	MUESTREO			
	0	1	2	3
0	74	244	249	84
5	93	211	286	287
50	89	189	117	871
500	115	174	117	454

**Tabla 7:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos en hojas de vid durante el experimento realizado en Almadenejos.

Por su parte, las hojas de las vides (tabla 7) arrojaron un valor promedio en Almadenejos de  $240 \text{ ng g}^{-1}$  con un rango de  $74\text{-}871 \text{ ng g}^{-1}$ .

En el experimento que regaba las plantas de olivo con solo 0 o  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , las hojas de olivo regadas con mercurio (tabla 8) arrojaron un valor promedio en Almadenejos de  $91 \text{ ng g}^{-1}$  mientras que en Ciudad Real era de  $45 \text{ ng g}^{-1}$ . Los rangos fueron de  $25\text{ - }184 \text{ ng g}^{-1}$  en Almadenejos y  $11\text{ - }81 \text{ ng g}^{-1}$  en Ciudad Real.

			MUESTRAS			
LOCALIDAD	TIPO HOJA	Hg Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	1	2	3
CIUDAD REAL	JOVEN	0	20	7	6	13
CIUDAD REAL	JOVEN	50	31	26	11	23
CIUDAD REAL	VIEJA	0	60	73	65	126
CIUDAD REAL	VIEJA	50	52	81	61	74
ALMADENEJOS	JOVEN	0	22	39	19	19
ALMADENEJOS	JOVEN	50	25	28	58	58
ALMADENEJOS	VIEJA	0	124	80	79	79
ALMADENEJOS	VIEJA	50	115	86	184	172

**Tabla 8:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento en hojas jóvenes y viejas de olivos de Ciudad Real y Almadenejos.

Las hojas de vid, sin embargo, mostraron un promedio de mercurio total en las plantas regadas con mercurio de  $316 \text{ ng g}^{-1}$  en Almadenejos,  $82 \text{ ng g}^{-1}$  en Ciudad Real y  $49 \text{ ng g}^{-1}$  en Puertollano, con unos rangos de  $79\text{ - }871 \text{ ng g}^{-1}$  en Almadenejos, de  $60\text{ - }102 \text{ ng g}^{-1}$  en Ciudad Real y de  $19\text{ - }86 \text{ ng g}^{-1}$  en Puertollano (tablas 7, 9 y 10).

	MUESTREO			
Hg Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	1	2	3
0	74	64	37	52
50	94	74	60	102

**Tabla 9:** Valores de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos en hojas de vid durante el experimento realizado en Ciudad Real.

Muestreo	Tiempo de exposición (días)	Riego 50 $\text{ng L}^{-1}$	Riego 0 $\text{ng L}^{-1}$
0	7	45	23
1	21	86	83
2	35	47	63
3	56	19	45

**Tabla 10:** Datos de mercurio total obtenido en vides con relación al tiempo de exposición, en Puertollano.

Si comparamos los resultados obtenidos en Almadenejos con los obtenidos en Ciudad Real, se observan concentraciones muy distintas en función de la especie considerada: en las hojas de olivo el valor promedio de mercurio en hoja en Almadenejos fue de  $91 \text{ ng g}^{-1}$ , mientras que era de  $316 \text{ ng g}^{-1}$  en plantas de vid. Si consideramos esta diferencia de especies en Ciudad Real, una localidad libre de MGT, el promedio en olivo fue de  $45 \text{ ng g}^{-1}$ , y de  $82 \text{ ng g}^{-1}$  en plantas de vid. La capacidad de captación de mercurio de las plantas de vid es, así pues, considerablemente superior a la mostrada por las plantas de olivo, un dato que puede estar relacionado con el ciclo de fotosíntesis de ambas especies y con la posibilidad de que la conductancia estomática sea contrastadamente diferente en ambas especies.

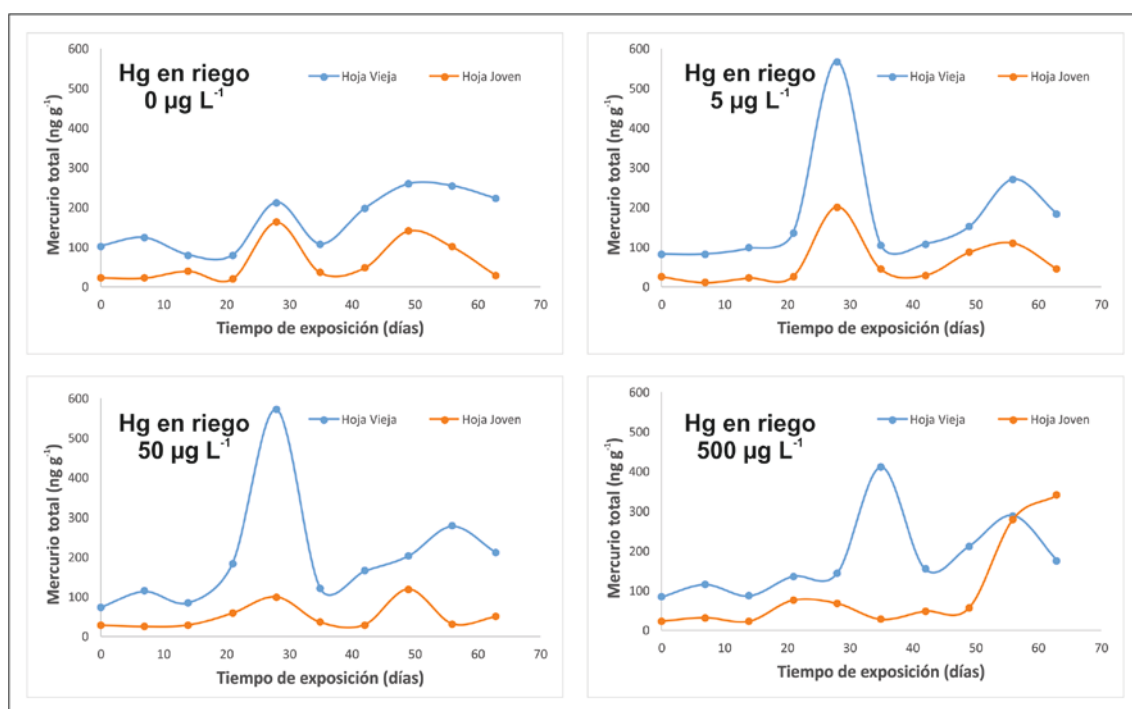
También puede afirmarse que se ha detectado una alta variabilidad en los contenidos promedio de mercurio total, debido a que el experimento incluye especies distintas de plantas, regadas con distintas cantidades de mercurio en localizaciones distintas en cuanto a sus contenidos en MGT. A pesar de esta variabilidad, una proporción de las hojas analizadas se encuentran dentro del rango ( $20\text{-}180 \text{ ng g}^{-1}$ ) de los valores descritos por Bargagli (1995) en un área de Italia no contaminada, especialmente las plantas de olivo en cualquier circunstancia y las plantas de vid que permanecieron en Ciudad Real o Puertollano, y fueron regadas sin mercurio.

La figura 26 ofrece una comparativa de los contenidos de mercurio en las hojas viejas y jóvenes de los olivos que se tuvieron en Almadenejos. Como puede observarse en los cuatro gráficos, los valores de las hojas viejas son casi siempre más altos que los valores en las hojas jóvenes en los mismos periodos de muestreo. Este hecho de observación puede ser explicado de tres modos:

El mercurio aportado mediante el agua de riego se incorpora a la planta y ésta lo destina preferencialmente a las hojas totalmente desarrolladas (viejas) a efectos de detoxificación, puesto que éstas no son cruciales en las funciones de fotosíntesis y respiración de la planta.

El mercurio no procede del agua de riego, sino de la evaporación del mercurio contenido en el agua de riego a la atmósfera y la captación de las hojas de este MGT de forma directa. En esta posibilidad, el principal factor a considerar es la diferencia de conductancia estomática entre las hojas viejas y jóvenes. Una diferencia de conductancia estomática favorable a las hojas viejas (mayor en éstas que en las jóvenes) explicaría estas diferencias en los contenidos de mercurio.

Las diferencias de concentración se deben a efectos de dilución y/o turgencia de las hojas viejas frente a las jóvenes. Las hojas jóvenes están con frecuencia más turgentes que las viejas, es decir, contienen más cantidad de agua que diluye la concentración de mercurio observada en la hoja.



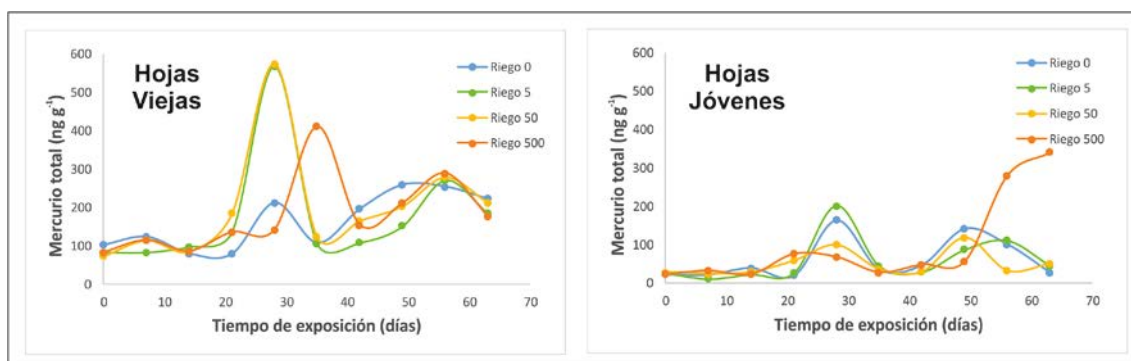
**Figura 26:** Concentración de mercurio total en hojas de olivo en Almadenejos, según la cantidad de mercurio en el agua de riego.

Es destacable el hecho de que a los 28 - 35 días de exposición se registre un máximo en casi todos los tipos de hoja y cantidad de mercurio en el riego. Aunque puede pensarse que este dato confirma la hipótesis de que el mercurio captado por la hoja proviene en su totalidad del MGT, no se puede descartar que este periodo haya tenido unas condiciones micrometeorológicas favorables al desarrollo de la planta que incrementen sus funciones metabólicas y, de este modo, se incremente también la capacidad de las plantas de captar el mercurio aportado por el agua de riego.

También es destacable el único punto en el que los contenidos de mercurio total en hoja son más altos en las hojas jóvenes que en las viejas, al final del experimento, tras más de 60 días de exposición y solo en las plantas regadas con 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Es solo un dato y no pueden extraerse conclusiones remarcables de él, aunque pudiera ser un indicio de que las hojas viejas y jóvenes tengan una respuesta diferente al estrés que supone ser regadas con esta concentración de

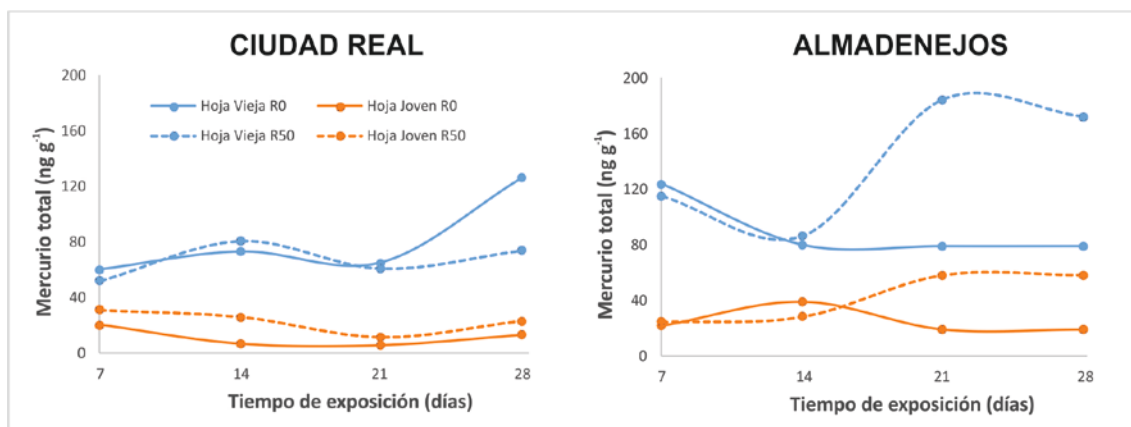
mercurio solubilizado en el agua de riego, una respuesta que se torna diferente cuando la planta se ha adaptado al mercurio aportado.

La figura 27, sin embargo, ofrece una comparativa de los contenidos de mercurio total en hojas según sus diferentes aportaciones de mercurio solubilizado en el agua de riego. Los valores de mercurio en hoja son más altos en las hojas viejas que en las jóvenes, mostrando una evolución similar en todos los tipos de riego. Los máximos se alcanzaron transcurridos 28 – 35 días desde el comienzo del experimento, claramente no debido al mercurio contenido en el agua de riego, puesto que las regadas con más mercurio ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) eran las que menos mercurio mostraban en las hojas jóvenes o las que tardaron más tiempo en alcanzar el máximo en las hojas viejas (35 días frente a los 28 de las regadas con 5 y  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



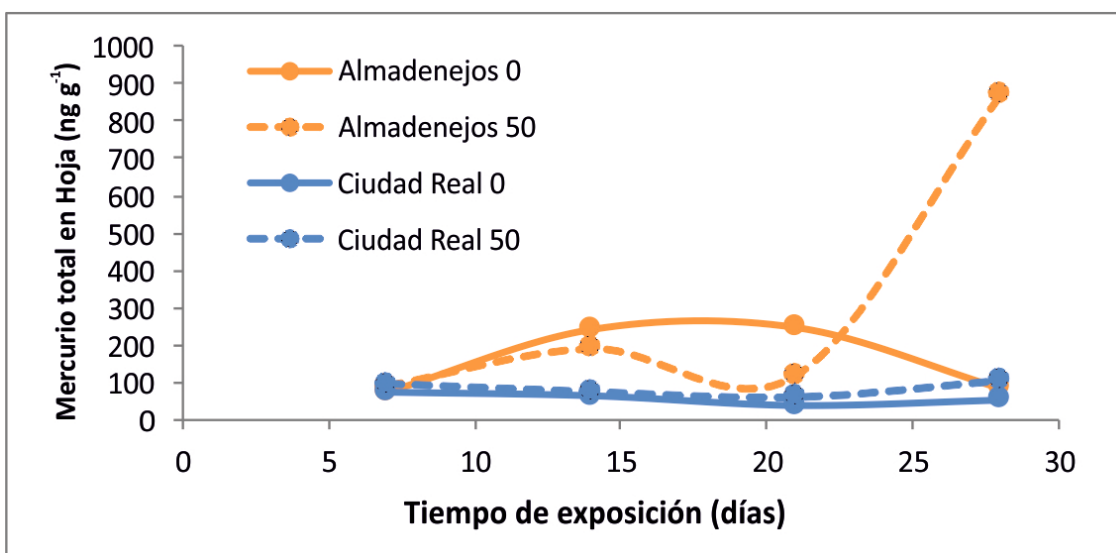
**Figura 27:** Concentración de mercurio total en hojas de olivo en Almadenejos, según la edad de la hoja: vieja o joven.

Este experimento se simplificó a dos concentraciones en ambientes con contrastados niveles de MGT, bajo en Ciudad Real y alto en Almadenejos (figura 28). Como se puede observar en las gráficas, hay una gran diferencia entre la concentración de mercurio obtenido en las hojas viejas y las jóvenes. Aparentemente la concentración de mercurio acumulado en las hojas de olivo depende del riego al que está sometida la planta (figura 27); sin embargo, al observar la comparación que existe entre las hojas de olivo de Ciudad Real y las de las olivo de Almadenejos, vemos que el riego no aparece en absoluto como un factor influyente (figura 28), llegando a observarse que las hojas de olivo de Ciudad Real regadas con  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio tienen menor concentración que las que fueron regadas con agua libre de mercurio en Almadenejos; por tanto, la concentración de mercurio en las muestras de hojas recogidas parece depender sólo y exclusivamente del MGT que existe en la zona.



**Figura 28:** Concentración de mercurio total en hojas viejas y jóvenes de olivo en Ciudad Real y Almadenejos.

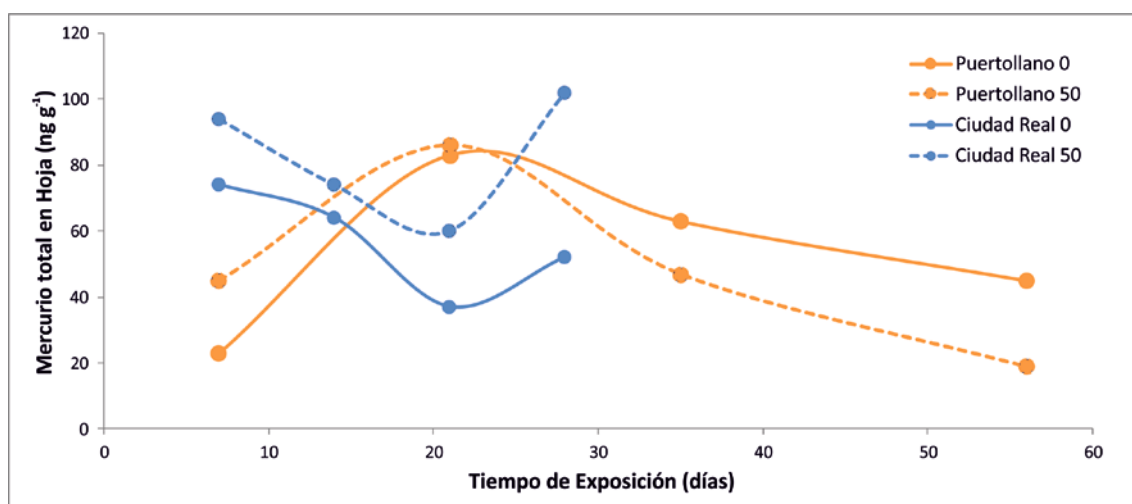
La figura 29 expone los resultados de este mismo experimento en plantas de vid y con solo dos concentraciones distintas de mercurio: 0 y 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Se observa claramente que las plantas regadas con mercurio mantuvieron niveles más elevados de mercurio en hoja en las dos localizaciones, aunque las plantas ubicadas en un ambiente con MGT en la atmósfera mostró valores más elevados en el cuarto muestreo en las plantas regadas sin mercurio. También se observó que los valores de mercurio en hoja eran más elevados en la ubicación con MGT en la atmósfera que en el área prístina en términos de mercurio en aire, evidenciando que la captación foliar directa de la atmósfera es más importante que la radicular. De hecho, las plantas que mostraron más mercurio en hoja en el área con MGT en la atmósfera fueron las regadas sin mercurio, afianzando esta idea.



**Figura 29:** Concentración de mercurio total en hojas de vid en Ciudad Real y Almadenejos.

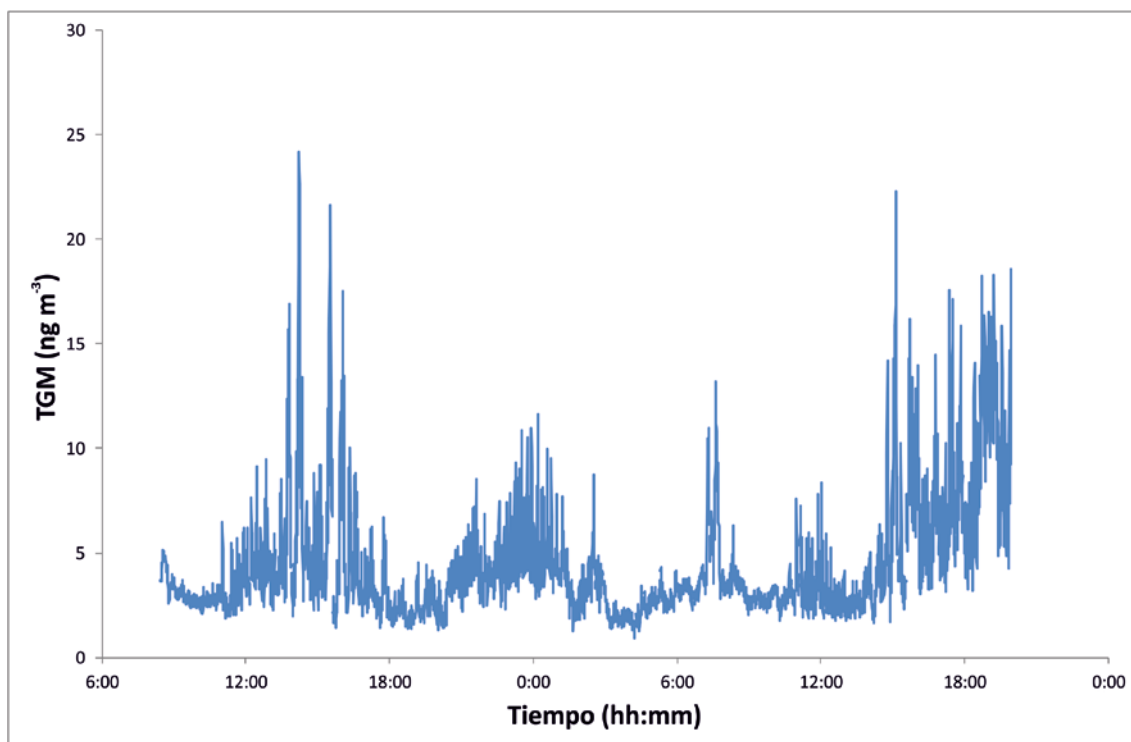
Al observar los datos del contenido de mercurio en las hojas de vid de Ciudad Real, se observó una tendencia al alza de todos los valores registrados en el último muestreo, especialmente de los valores de mercurio en hoja regadas con y sin mercurio (figura 29). La evolución de las hojas regadas con y sin mercurio parece indicar que no se trata de oscilaciones de contenidos de mercurio relacionadas con el intercambio con la atmósfera, puesto que alcanza máximos

importantes para tratarse de una localización sin MGT en la atmósfera. Para esclarecer este punto, se repitió el experimento con plantas de vid en otra zona libre de MGT, la ciudad de Puertollano. Se observó que el contenido de mercurio total en las hojas de vid variaba en función del tiempo de exposición. Al principio el contenido de mercurio total en las hojas fue de  $21 \text{ ng g}^{-1}$ , mostrando un incremento de mercurio en los primeros 20 días (tabla 10), (figura 30), donde se observa mayor contenido de mercurio en las hojas de las plantas que fueron regadas con  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  mercurio que en las que se regaron con agua. A partir de ahí, las hojas empezaron a perder mercurio, al principio al mismo ritmo de adquisición, pero finalmente a un ritmo más lento, llegando a mantener más cantidad de mercurio las plantas que se regaron con agua sin mercurio. Como puede verse en la comparativa con los valores del experimento de Ciudad Real, el mayor tiempo de exposición ofreció la esperada disminución del mercurio en las hojas de vid; por lo tanto, es posible que el ascenso del ultimo muestreo del experimento de Ciudad Real se deba a oscilaciones en el proceso de intercambio con la atmósfera.



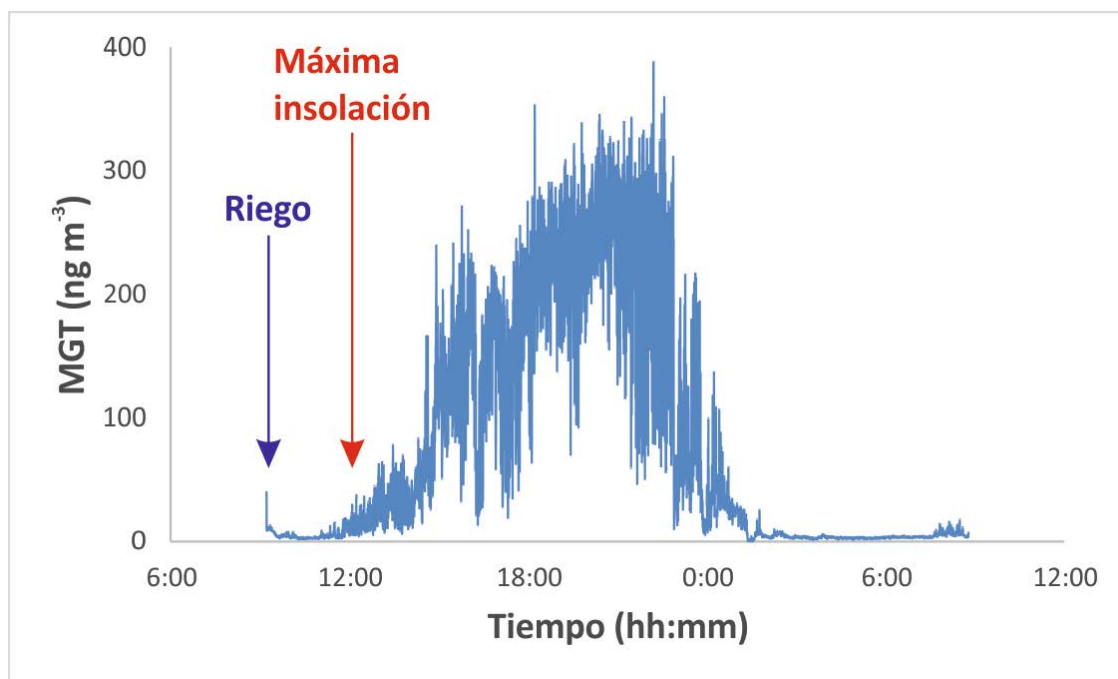
**Figura 30:** Evolución de los contenidos de mercurio total obtenido en hojas de vid en Puertollano con relación al tiempo de exposición y en comparación con los datos de Ciudad Real.

Durante el periodo de tiempo del experimento, el MGT mostró valores superiores a los esperables en Puertollano en condiciones normales (Martinez-Coronado et al., 2015) (figura 31). A pesar de que los niveles de fondo estaban en un rango esperable ( $2\text{-}3 \text{ ng m}^{-3}$ ), se observaron incrementos diurnos y nocturnos en la concentración de MGT. Probablemente los ascensos diurnos se produjeran cuando el sol incidía en las macetas, calentando el suelo y provocando la emisión de mercurio contenido en dicho suelo, mientras que, en los periodos nocturnos, la ausencia de viento sería la causa más probable del ascenso de los niveles de MGT. Por lo tanto, las condiciones de ausencia total de mercurio gaseoso en la atmósfera del experimento no fueron conseguidas, por lo que la absorción de mercurio de las hojas puede ser consecuencia tanto de absorción radicular como foliar.



**Figura 31:** Mercurio gaseoso total en el área de las plantas los días 28/29 de julio de 2016.

Al observar los niveles de MGT tras un riego en un día concreto del mes de agosto (figura 32), el comienzo del ascenso observado de las concentraciones de MGT fue no coincidente con el momento de riego (09:00), sino con el momento de máxima insolación de las macetas ( $\pm 12:00$ ). El ascenso nocturno de los niveles de MGT no se aprecia en este caso, tal vez por ser un día con viento, o porque las emisiones del mercurio procedente de la evaporación del agua de riego cesaron al decrecer la temperatura y radiación solar.



**Figura 32:** Mercurio gaseoso total en el área de las plantas los días 22 y 23 de agosto de 2016.

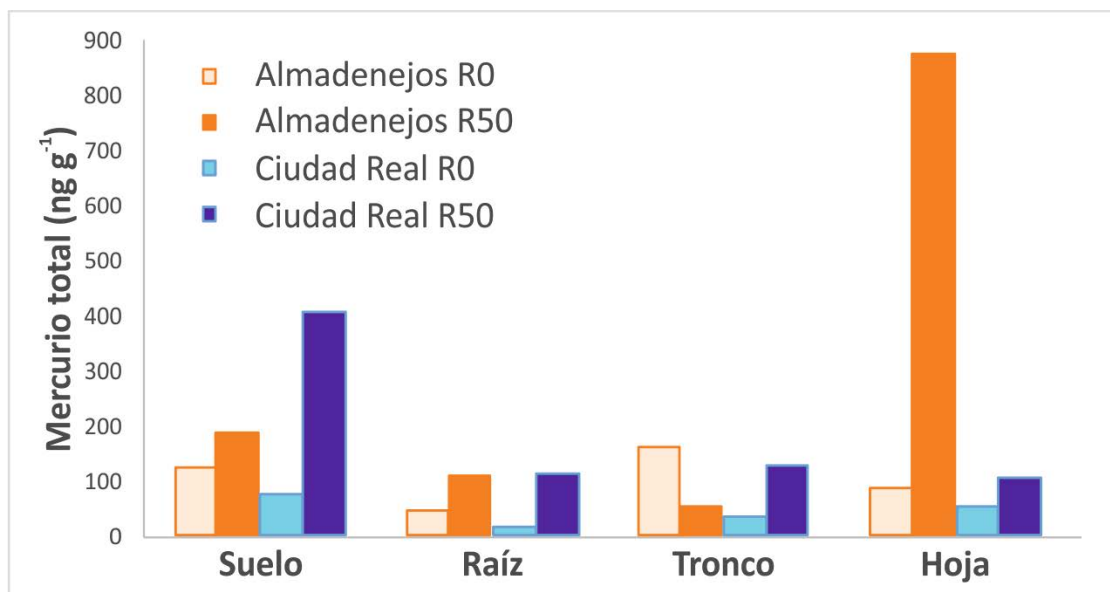
Al terminar el experimento han sido analizados el tronco, la raíz y el suelo de las vides, tanto de las de Almadenejos como de las de Ciudad Real (tabla 11). Si se atiende a las tendencias de los datos de la tabla en función del mercurio contenido en el agua de riego, se puede observar que no hay una tendencia claramente creciente, a menudo las partes de la planta regadas con agua libre de mercurio tienen más mercurio en los tejidos de la planta que las regadas con 5 ó 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esto solo sucede cuando la variable mercurio atmosférico está en juego (Almadenejos), puesto que en Ciudad Real siempre tienen más mercurio las regadas con 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio en el agua.

	Tronco	Suelo	Raíz
<b>Vides Almadenejos</b>			
<b>Riego 0 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	159	124	46
<b>Riego 5 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	38	98	118
<b>Riego 50 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	50	183	106
<b>Riego 500 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	244	1607	506
<b>Vides Ciudad Real</b>			
<b>Riego 0 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	30	73	14
<b>Riego 50 <math>\mu\text{g l}^{-1}\text{Hg}</math></b>	124	404	109

**Tabla 11:** Datos de concentraciones de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) en tronco, suelo y raíz, en vides de Almadenejos y Ciudad Real.

Una vez recopilados los datos, se observa la influencia del riego, ya que a medida que va aumentando el riego, aumenta la concentración de mercurio tanto en tronco como en suelo, raíz y hoja (figura 33). Es necesario destacar que esta tendencia se mantiene tanto en las plantas que han sido regadas con 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio en el agua como en aquellas que han sido regadas con agua libre de mercurio, con la excepción de los troncos de las vides de Almadenejos regadas con agua libre de mercurio. Del mismo modo, las plantas regadas con mercurio tienen concentraciones de mercurio en el orden Hoja>Suelo>Raíz>Tronco en Almadenejos y Suelo>Tronco>Raíz>Hoja en Ciudad Real, lo que evidencia la captación foliar importante en Almadenejos y la acumulación en el suelo en el experimento de Ciudad Real. Por el contrario, las plantas que han sido regadas sin mercurio muestran un orden Tronco>Suelo>Hoja>Raíz en Almadenejos y de Suelo>Hoja>Tronco>Raíz en Ciudad Real, mostrando únicamente diferencias en la posición del contenido de mercurio en tronco, el más alto en Almadenejos y casi el más bajo en Ciudad Real.





**Figura 33:** Gráfico comparativo de datos de concentración de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) en suelo, raíz, tronco y hojas en vides de Almadenejos y Ciudad Real al finalizar el experimento de cuatro semanas. Abreviaturas: R0 (riego con  $0 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio); R50 (riego con  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio).

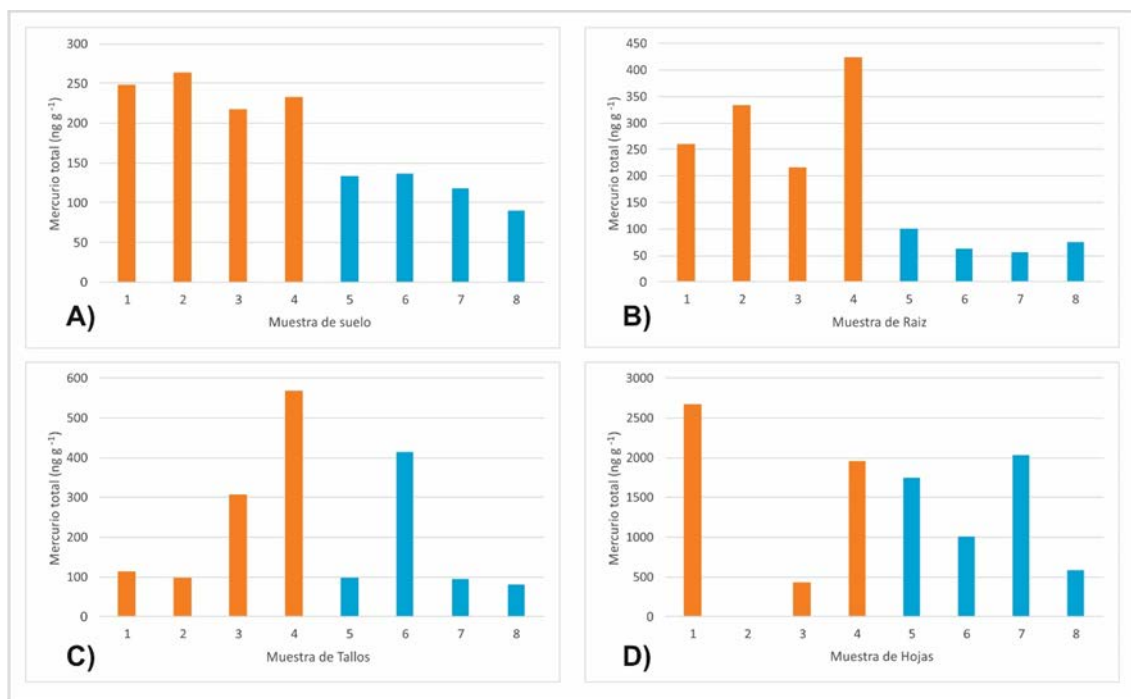
Con las muestras del experimento realizado en Puertollano, se estudió además la fracción de mercurio lixiviable, pH, conductividad y contenido en materia orgánica en el suelo, así como los contenidos de mercurio en distintas partes de la planta (raíz, tallo y hojas). Todos estos datos se resumen en la tabla 12. Hay que destacar que las plantas que fueron regadas con mercurio han mostrado contenidos más elevados tanto en el suelo como en la raíz, tallo y hojas. También es destacable que las diferencias entre las plantas regadas con mercurio y las regadas con agua mineral han sido más importantes en lo que se refiere a los contenidos medidos en raíz, lo que evidencia que el mercurio del agua de riego era acumulado de forma más efectiva en las raíces que en el suelo, es decir, que la capacidad de bioacumulación de las raíces parece ser mayor que la del suelo.

Sin embargo, las diferencias de mercurio en el suelo entre plantas regadas con y sin mercurio no han sido muy elevadas. Este sorprendente hecho podría querer decir que parte del mercurio que hay en el suelo proviene de deposición atmosférica y es retenido en el suelo en la fracción orgánica, mientras que una pequeña parte del mercurio aportado en el riego también es retenida en esta fracción orgánica. Este hecho puede estar relacionado con que el suelo que se ha utilizado en el experimento no es propiamente un suelo, sino mantillo con contenidos muy altos en materia orgánica (>75%), lo que convierte al suelo en un receptor potencial de la deposición de mercurio atmosférico, al ser higroscópico, lo que implica una posibilidad de absorción del vapor de agua atmosférico, con el que puede también captarse el mercurio. Por lo tanto, cuando estudiemos los compuestos de mercurio formados en el suelo, deberemos tener en cuenta que las fuentes de adquisición de mercurio por parte del suelo han sido dos, el mercurio procedente del agua de riego y el mercurio gaseoso procedente de la atmósfera.

		Suelo					Tallo	Hoja	Raíz
		<i>Hg Total</i>	<i>Hg Lix.</i>	<i>pH</i>	<i>Cond.</i>	<i>MO</i>			
Promedio	50 µg Hg L <sup>-1</sup>	241	0,47	7	3	80	271	1685	309
	0 µg Hg L <sup>-1</sup>	119	0,06	7	2	82	172	1342	74
Mínimo	50 µg Hg L <sup>-1</sup>	218	0,29	6	3	77	96	426	217
	0 µg Hg L <sup>-1</sup>	90	0,01	7	1	78	80	579	56
Máximo	50 µg Hg L <sup>-1</sup>	264	0,70	7	4	85	567	2670	425
	0 µg Hg L <sup>-1</sup>	136	0,10	7	3	84	414	2030	101
SD	50 µg Hg L <sup>-1</sup>	20	0,17	0	0	3	219	1147	91
	0 µg Hg L <sup>-1</sup>	21	0,04	0	1	3	162	666	20

**Tabla 12:** Resumen estadístico de los datos de mercurio total en suelo, raíz, tallo y hojas, de mercurio lixiviable en los suelos y algunos parámetros edáficos del suelo (pH, conductividad eléctrica y materia orgánica).

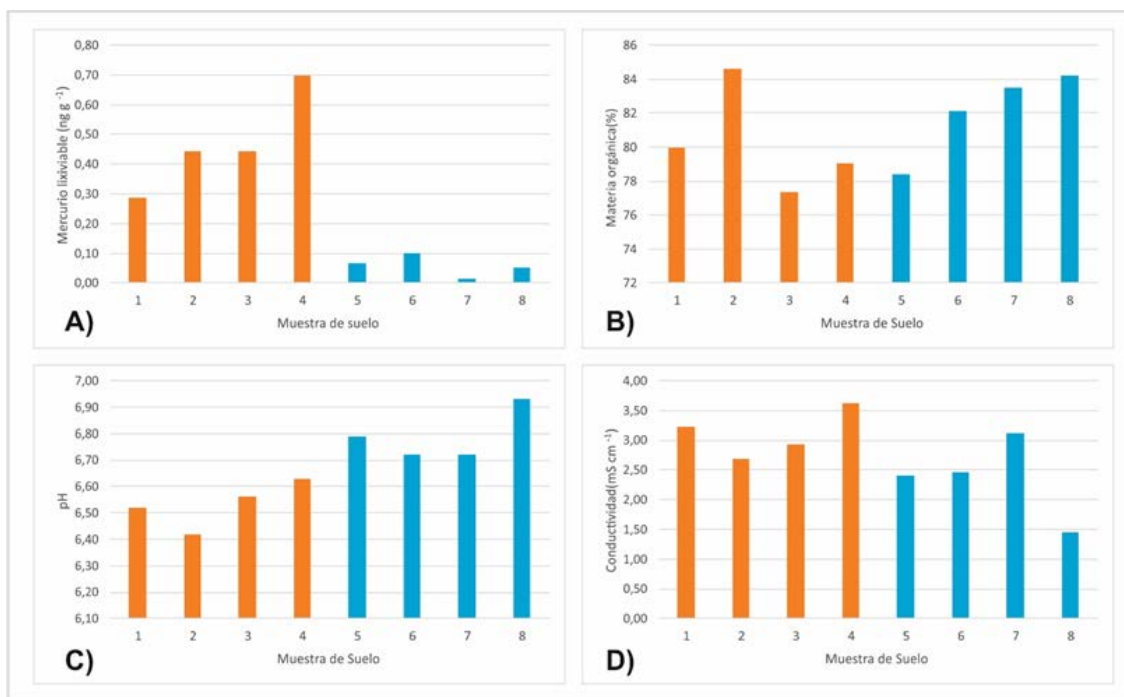
Para aclarar más este asunto podemos focalizar la atención en las muestras que no fueron regadas con mercurio. En ellas el mercurio depositado tiene que ser por fuerza atmosférico, posteriormente depositado en el suelo (barras azules en la figura 34A). Este mercurio atmosférico depositado en el suelo se habría transferido a las raíces en una proporción mayor (figura 34B) que el mercurio procedente de dos fuentes (atmosférica y riego) que había en los suelos regados con mercurio. Esta transferencia no se observa en los tallos (figura 34C), o al menos los datos no son concluyentes. Los niveles de mercurio en hoja (figura 34D) parecen ser independientes de que la planta haya sido regada con o sin mercurio. Por lo tanto, si los contenidos de mercurio en hoja no son dependientes de si la planta se ha regado o no con mercurio, podemos deducir que la captación de mercurio por parte de las hojas es enteramente atmosférica y que no hay participación del mercurio aportado al suelo por el agua de riego.



**Figura 34:** Contenidos en mercurio total de las muestras de suelo (A), raíz (B), tallo (C) y hoja (D).

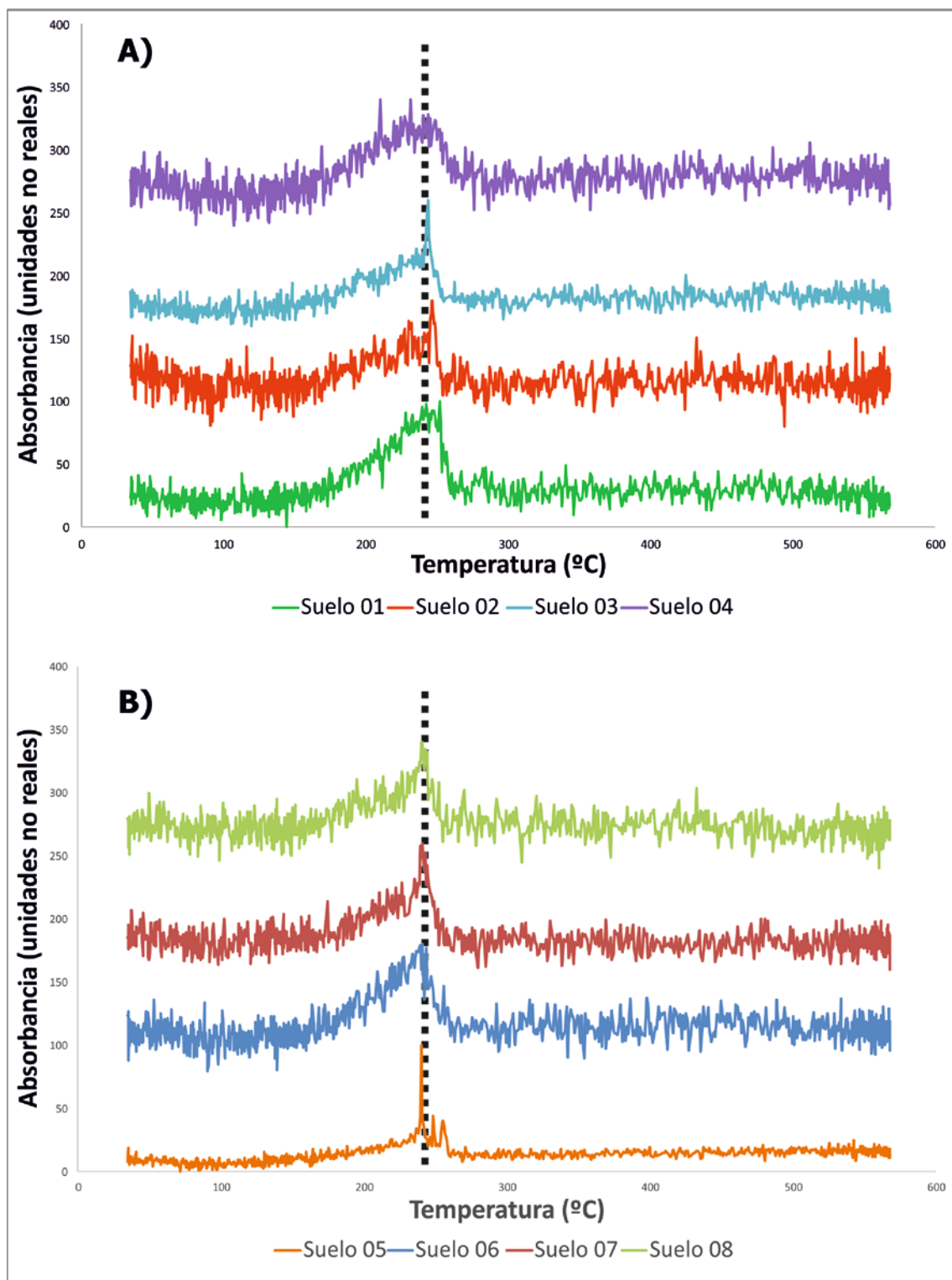
La figura 34 nos pone en relación los contenidos de mercurio lixiviable con tres parámetros edáficos determinados en los suelos de las plantas del experimento: pH, conductividad eléctrica y contenido en materia orgánica total. Los valores de mercurio lixiviable aparecen como muy altos en las plantas regadas con mercurio, siendo casi inapreciables en las regadas con agua sin mercurio (figura 35A). Podemos deducir que si el mercurio es retenido del agua de riego produce una gran cantidad de mercurio lixiviable, pero que si es depositado de la atmósfera (muestras en azul en la figura 35A), la fracción lixiviable es casi inexistente. Este hecho también deberá de tenerse en cuenta cuando se razonen los datos de especiación de mercurio en los suelos, para dirimir si existen distintos compuestos que produzcan distintas proporciones de mercurio lixiviable.

También se observan muy ligeras diferencias entre las plantas regadas con y sin mercurio en el pH (figura 35C), siendo muy ligeramente más ácidas (0,2 en la variación de pH) las regadas con nitrato de mercurio diluido y menos ácidas las regadas con agua mineral, como era de esperar. Los valores de conductividad y materia orgánica no son significativamente diferentes, aunque en el caso de la materia orgánica parece observarse una disminución en las muestras regadas sin mercurio. Esto podría tener relación con el incremento de la actividad bacteriana debido a la presencia de mercurio disponible, como Campos et al. (2018) defienden en un artículo reciente.



**Figura 35:** Contenido en mercurio lixiviable (A) y otros parámetros edáficos de las muestras de suelo: materia orgánica (B), pH (C) y conductividad (D). Las muestras de plantas regadas con mercurio aparecen en color rojo y las regadas con agua mineral en azul.

La información acerca del compuesto que el mercurio forma en el suelo se obtuvo mediante especiación térmica (figura 36). Los datos de especiación térmica de mercurio en los suelos han ofrecido datos sorprendentes, puesto que solo se ha podido detectar la presencia de mercurio en forma de mercurio orgánico (o mercurio ligada a la fracción orgánica del suelo, a los ácidos húmicos en concreto). La temperatura de desorción de los compuestos de mercurio formados en los suelos en los que se acumuló del agua de riego (figura 36A) y por deposición atmosférica (figura 36B), y en los suelos en los que se acumuló solo por deposición atmosférica fue la misma, lo que supone que la procedencia del mercurio o la forma iónica ( $Hg^0$  en la atmósfera y  $Hg^{2+}$  en el agua de riego) no influyen en la forma en la que un suelo rico en materia orgánica puede acumular el mercurio. Las diferencias en mercurio lixiviable (figura 35A) sugieren la presencia de al menos dos compuestos de mercurio en función de su procedencia, aunque la pequeña proporción que supone el mercurio lixiviable respecto del mercurio total (0,20% en plantas regadas con mercurio y 0,04% en plantas regadas sin mercurio) podría explicar esta discrepancia.



**Figura 36:** Perfiles de desorción del mercurio contenido en las muestras de suelo que se regaron con mercurio (A) y sin mercurio (B).

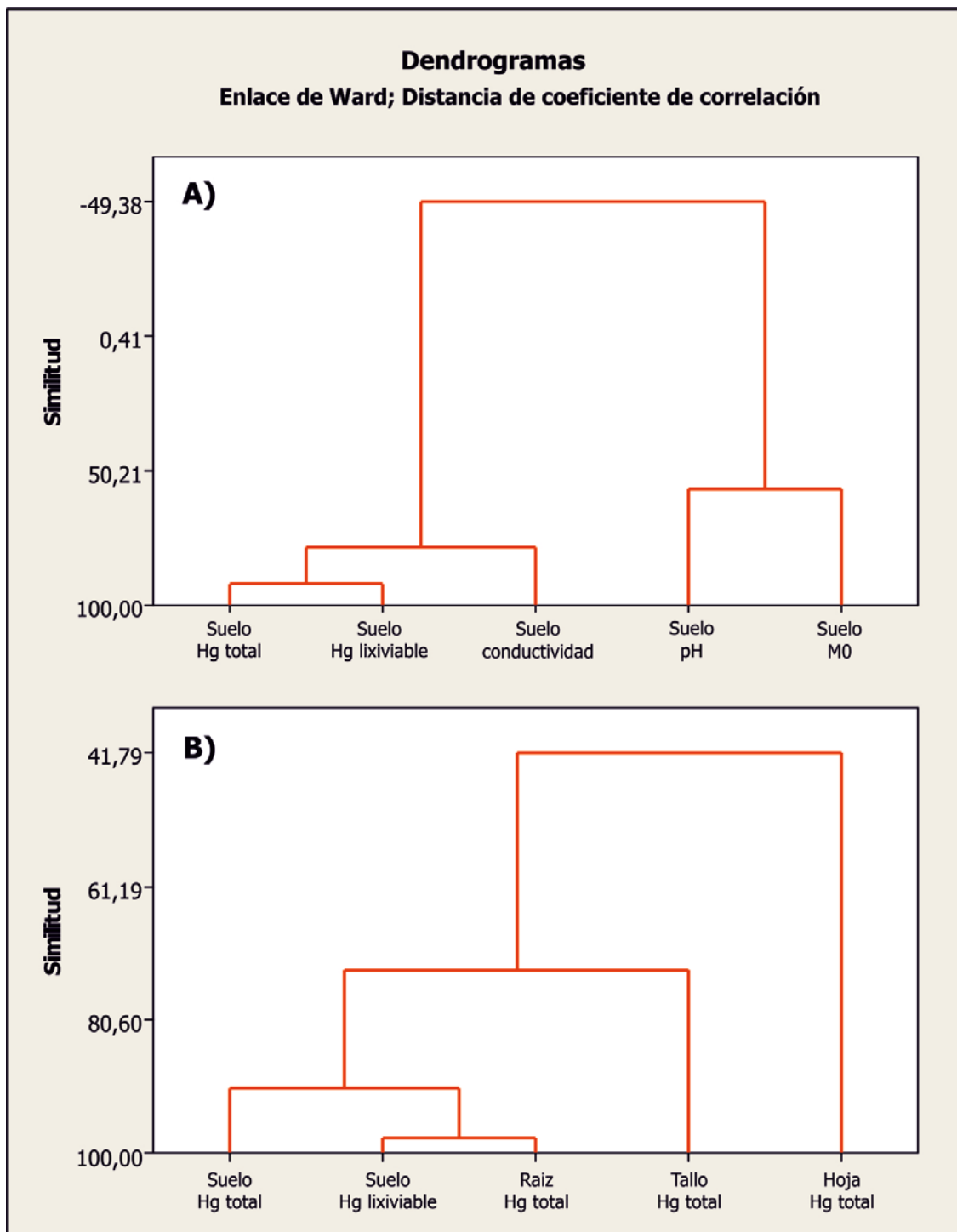
Un análisis de correlaciones entre todos los parámetros medidos (mercurio total en suelo, mercurio total en raíz, mercurio total en tallo, mercurio total en hoja, mercurio lixiviable en suelo, pH, conductividad y materia orgánica), indica que los parámetros más relacionados (correlaciones más altas) se encuentran en la zona de raíces de la planta, concretamente entre la fracción lixiviable del suelo y el mercurio total de la raíz (tabla 13). Esto confirma la hipótesis

planteada anteriormente de que el mercurio aportado en el agua de riego es la fuente principal de mercurio de la acumulación del elemento en las raíces de las plantas. Esta idea se ve también corroborada por las altas correlaciones del mercurio total en la raíz con el mercurio total del suelo y el pH del suelo (inducido muy probablemente por la solución ácida de riego con mercurio). En este sentido, también se ha detectado una correlación alta entre el pH del suelo y el contenido en mercurio total, lo que indica que el mercurio aportado en el agua de riego como solución ácida ha tenido un efecto depresor del pH. Por último, se ha detectado una correlación significativa en el suelo entre el mercurio total y el lixiviable, lo que podría significar que el fraccionamiento entre ambos tipos de mercurio sigue unos patrones similares en los suelos regados con mercurio y en los no regados con mercurio.

	Suelo Hg Total	Suelo Hg Lix	Suelo pH	Suelo Cond	Suelo MO	Tallos Hg	Hoja Hg
Suelo Hg Lix	<b>0,834</b> <i>0,010</i>						
Suelo pH	<b>-0,933</b> <i>0,001</i>	-0,661 <i>0,074</i>					
Suelo Cond	0,652 <i>0,080</i>	0,625 <i>0,098</i>	-0,649 <i>0,082</i>				
Suelo MO	-0,287 <i>0,491</i>	-0,383 <i>0,35</i>	0,142 <i>0,738</i>	-0,438 <i>0,278</i>			
Tallos Hg	0,244 <i>0,561</i>	0,605 <i>0,112</i>	-0,114 <i>0,789</i>	0,467 <i>0,243</i>	-0,428 <i>0,29</i>		
Hoja Hg	0,389 <i>0,389</i>	0,097 <i>0,836</i>	-0,400 <i>0,374</i>	0,621 <i>0,137</i>	-0,078 <i>0,868</i>	-0,123 <i>0,793</i>	
Raíz Hg	<b>0,888</b> <i>0,003</i>	<b>0,954</b> <i>0,000</i>	<b>-0,707</b> <i>0,050</i>	0,625 <i>0,098</i>	-0,265 <i>0,525</i>	0,426 <i>0,293</i>	0,342 <i>0,452</i>

**Tabla 13:** Matriz de correlación entre las principales medidas realizadas. En negrita aparecen correlaciones significativas y en cursiva el valor de p.

Para detectar las relaciones entre los parámetros estudiados tomados en su conjunto y no por parejas, como se hacía en la matriz de correlación, se ha realizado un análisis multivariante, descrito por los dendrogramas de la Figuras 37A y B. En la Figura 37A se ha intentado ver las relaciones que había entre todos los parámetros que afectan o son relativos al suelo. En el dendrograma podemos observar que tanto el mercurio total como el lixiviable solo están relacionados con la conductividad, pero no con el pH o la materia orgánica. Esto indica que la presencia de mercurio en el suelo está relacionada con la cantidad de sales, probablemente aportadas en el agua de riego, más alta en las regadas con sales de mercurio. Sin embargo, el pH y la materia orgánica aparecen en un grupo aparte, cuando sería esperable que pH y conductividad estuvieran en el mismo grupo puesto que provienen ambos del agua de riego con mercurio. No tenemos una explicación para esta diferencia estadística, aunque seguramente se deba a que las diferencias de pH son mínimas, de solo un 0,2, entre el promedio de las macetas con mercurio y las macetas sin mercurio en el agua de riego.



**Figura 37:** Dendrogramas de los parámetros edáficos del suelo y los contenidos de mercurio total y lixiviable (A) y de niveles de mercurio en distintos compartimentos del experimento (B).

En la figura 37B se ofrece el dendrograma de los contenidos de mercurio en suelo y diferentes partes de la planta. En él se puede observar que todos los parámetros tienen niveles de similitud altos, por lo que pertenecerían al mismo grupo, aunque aparecen como más relacionados los contenidos de mercurio total en suelo y raíz con el mercurio lixiviable en suelo. Este subgrupo delimitaría la captación radicular, que al parecer existe. A más distancia de este subgrupo, es decir, relacionado de forma más débil, aparecen los contenidos de

mercurio en las hojas y los tallos, lo que sugiere la opción explicada con anterioridad de absorción directa del mercurio atmosférico por parte de las hojas.

Las conclusiones preliminares de este apartado experimental de estudio de los flujos de mercurio en la interfase suelo-panta- atmósfera en Puertollano indican que la captación radicular existe, aunque parece inferior a la captación atmosférica; que las raíces captan el mercurio más eficazmente que el suelo si éste es añadido en el agua de riego; que el origen del mercurio en los suelos regados con mercurio procede tanto del agua de riego como directamente de la atmósfera; que el origen del mercurio de los suelos regados sin mercurio solo proviene de la atmósfera; que la cantidad de materia orgánica proporciona al suelo capacidad de absorción de mercurio atmosférico; que el mercurio en el suelo procedente de la atmósfera ( $\text{Hg}^0$ ) es menos lixiviable que el mercurio aportado en el agua de riego ( $\text{Hg}^{2+}$ ); y que el mercurio en el suelo aparece solo como mercurio orgánico, independientemente de que el origen sea  $\text{Hg}^0$  o  $\text{Hg}^{2+}$ .

Quedan todavía puntos controvertidos acerca de las rutas de transporte del mercurio en el sistema suelo-planta. Por un lado, muchos autores no consideran que las plantas puedan captar el mercurio directamente de la atmósfera, mientras otros niegan que la captación a través de las raíces se produzca. Con este experimento se ha podido determinar que la captación radicular existe, pero que es menos importante que la captación foliar-atmosférica. Además de esto, el mercurio iónico es más eficazmente captado por las raíces que por el suelo, seguramente porque la planta es capaz de incorporarlos a sus tejidos. Carrasco-Gil et al (2013) describe que plantas como la alfalfa pueden acumular el mercurio en la pared celular e incluso producir cambios estructurales en la célula para acumularlo. También indica que el mercurio aparecía ligado fundamentalmente a biotioles y proteínas en los tejidos de la planta, lo que implica que la planta ha procesado metabólicamente este mercurio. Sin embargo, el mercurio absorbido como  $\text{Hg}^{2+}$  es incorporado en el suelo a complejos orgánicos en presencia de grupos funcionales que contienen S (Biester et al., 2002). Por lo tanto, parece que los biotioles y las proteínas de las raíces de las plantas son más eficaces fijando el  $\text{Hg}^{2+}$  que los ácidos húmicos en presencia de compuestos con S del suelo.

Otro descubrimiento sorprendente es que, en el suelo, tanto el  $\text{Hg}^0$  como el  $\text{Hg}^{2+}$  son fijados por los ácidos húmicos únicamente, lo que implica algún proceso de oxidación o transformación del  $\text{Hg}^0$  previo a su deposición en el suelo, o previo a su fijación a los ácidos húmicos. La posibilidad de la oxidación atmosférica y posterior deposición es la más factible, puesto que se han descrito múltiples procesos de oxidación atmosférica del  $\text{Hg}^0$  por halógenos, ( $\text{NO}_3^-$ ), y otros (Si y Ariya, 2018). Sin embargo, el mercurio procedente de la atmósfera es menos lixiviable que el que procede del agua de riego, lo que indica que existe algún proceso que no conocemos que está distorsionando los valores de lixivabilidad. Una posibilidad es que el suelo sea capaz de fijar directamente  $\text{Hg}^0$  en los ácidos húmicos, y que este compuesto sea menos lixiviable que el formado por  $\text{Hg}^{2+}$  y ácidos húmicos. Esta posibilidad estaría avalada por las proporciones de  $\text{Hg}^{2+}$  que se han descrito en el área de Almadén (0,01%  $\text{Hg}^0$ ) (Martínez-Coronado, 2012), que hacen difícilmente justificable que todo el mercurio fijado de la atmósfera sea  $\text{Hg}^{2+}$  oxidado del  $\text{Hg}^0$  mayoritario en la atmósfera de Almadén. Y aun considerando la posibilidad de que el  $\text{Hg}^{2+}$  de la solución de riego haya sido emitido como  $\text{Hg}^{2+}$



a la atmósfera, es más lógico esperar que la materia orgánica del suelo estudiado haya reducido este  $\text{Hg}^{2+}$  antes de su emisión como  $\text{Hg}^0$ .

Esta conclusión tiene importantes implicaciones en el ciclo biogeoquímico del mercurio, y más concretamente en los procesos de captación de mercurio atmosférico, abriendo el campo de investigación de los mecanismos precisos de captación del mercurio gaseoso elemental por parte de la materia orgánica del suelo.

### 3.4. Cuarto experimento: desorción de mercurio en cultivos (olivo)

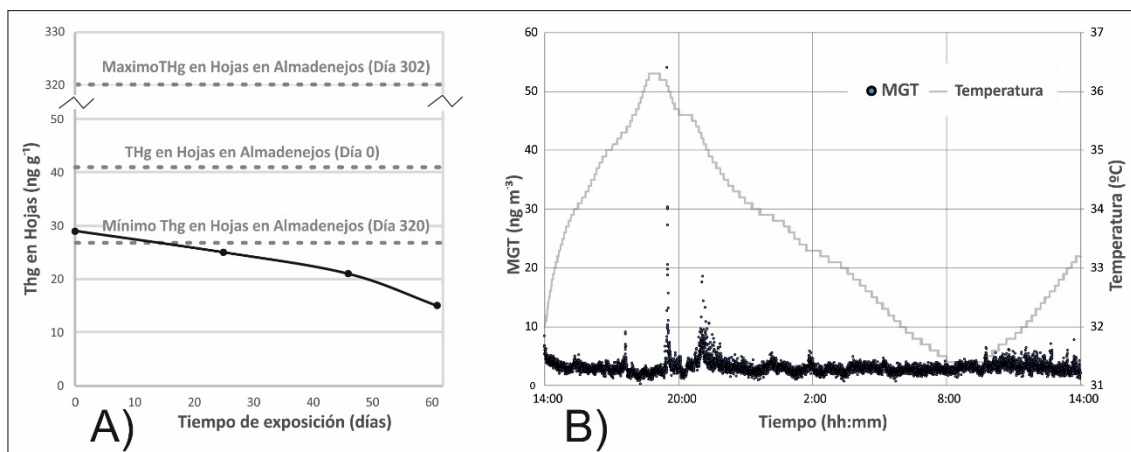
Este experimento fue diseñado y realizado para observar la desorción de mercurio en las hojas de olivo que previamente habían captado este elemento gaseoso atmosférico en Almadenejos. Para demostrar que la desorción del mercurio existe y por lo tanto este proceso de adquisición de mercurio por parte de plantas es reversible, este estudio se llevó a cabo usando olivos de diferentes experimentos previos (concretamente del primer y tercer experimento, explicados en los apartados 3.1. y 3.3.)

#### 3.4.1. Desorción del olivo procedente del primer experimento.

Para la realización de este experimento, se trasladó un olivo (concretamente el olivo 2) desde Almadenejos hasta Peñalsordo, localidad libre de altas concentraciones de MGT, como se ha redactado en el apartado 10 de la introducción. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras	Días de exposición	Fecha	Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Referencia
Muestra 0	0	08/07/2016	25	Esta tesis
Muestra 1	11	19/07/2016	21	Esta tesis
Muestra 2	17	25/08/2016	15	Esta tesis
Promedio			20	Esta tesis
Desviación estándar			5	Esta tesis
Mínimo			15	Esta tesis
Máximo			25	Esta tesis
Área no contaminada			20-180	Bargagli (1995)
Límite uso agrícola			200	Kabata-Pendias (2010)
Flix			481	Esbri et al. (2014)
Jódar			161	Higuera et al (2016)
Almadén			1213	Higuera et al. (2012)

**Tabla 14:** Valores de concentración de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) en hojas del Olivo 2 en Peñalsordo.



**Figura 38:** Desorción de mercurio en el olivo 2 (A) y gráfico de evolución de MGT durante un ciclo de 24 horas en el lugar del experimento

Claramente podemos observar, tanto en la tabla 14 como en la figura 38A, la desorción de mercurio en las hojas de olivo. Habiendo analizado tres muestreos, recogiendo cinco hojas de olivo por muestra, observamos que se ha obtenido un valor máximo de 25 ng g<sup>-1</sup>, un valor mínimo de 15 ng g<sup>-1</sup>, siendo el promedio de 20 ng g<sup>-1</sup>. Por lo tanto, teniendo en cuenta la referencia de Bargagli (1995), los valores máximos no sobrepasan los valores de fondo.

La presencia de MGT en Peñalsordo fue controlada por mediciones de ciclos diarios durante el experimento. Uno de los ciclos está representado en la figura 38B, obteniendo un 99,8 % de los valores que se encuentran por debajo de 10 ng m<sup>-3</sup> y 96,9% por debajo de 5 ng m<sup>-3</sup>. Estos niveles de MGT significan que Peñalsordo puede considerarse un sitio de fondo en términos de MGT presente en la atmósfera, especialmente si lo comparamos con datos obtenidos por Higuera et al. (2014), con valores de 0,3-10 ng m<sup>-3</sup> en Sudáfrica o 4-6 ng m<sup>-3</sup> en algunas ciudades brasileñas, o aquellas descritas por Weigelt et al. (2016) en Europa Central, que estaban en el rango 1,4-1,6 ng m<sup>-3</sup>.

También se pudo observar que los valores de MGT anómalos se alcanzaban al final de la tarde, ya que las temperaturas alcanzaban sus niveles máximos (figura 38B). Esbrí et al. (2016) describen este efecto para un área de Almadén, donde parece ser que la disminución de la velocidad del viento producía un aumento rápido en los niveles de MGT al final de la tarde.

Al finalizar el experimento se realizó un balance de masas siguiendo el mismo procedimiento que en Almadenejos (ver apartado 3.1.). Los resultados de este balance de masas mostraron que, durante la exposición al aire libre de MGT, uno de los olivos, concretamente el olivo 2, había desorbido una cantidad de 380 ng, ya que al comienzo del experimento tenía 1002 ng y al final obtuvo una cantidad de 621 ng. Por lo tanto, estas hojas de olivo perdieron el 37 % de su mercurio durante los 60 días del experimento, a una tasa aparentemente constante, con los datos de que se dispone, de unos 8,8 ng diarios.

Por su parte, las hojas de olivo tomadas de ejemplares locales, en el entorno de Peñalsordo, muestran una concentración promedio de 21±5 ng g<sup>-1</sup>, lo que pone en evidencia que los valores que se obtienen tras la desorción son similares a los del fondo local para este parámetro.

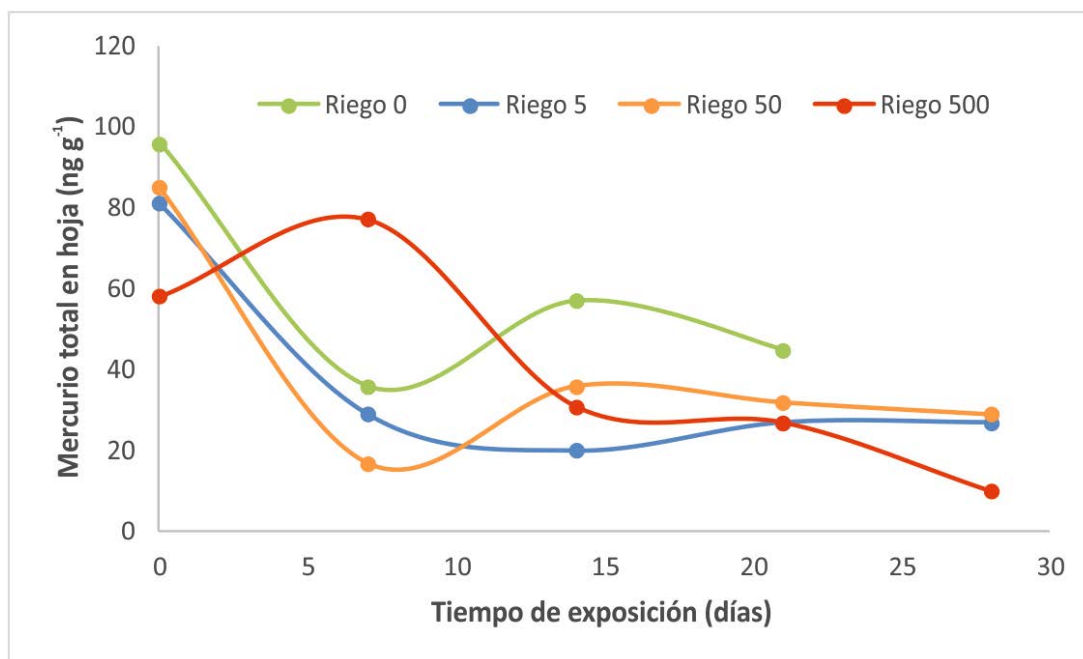
### 3.4.2. Desorción de olivos procedentes del experimento 3.

Para realizar este experimento de desorción se trasladaron los 12 olivos utilizados en el experimento 3 desde Almadenejos hasta Peñalsordo, localidad libre de MGT como se ha redactado en el apartado 4 de la introducción. Se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 15):

	MUESTREO				
Riego ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0	1	2	3	4
0	96	36	57	45	
5	81	29	20	27	27
50	85	17	36	32	29
500	58	77	31	27	10

**Tabla 15:** Valores de concentración de mercurio total (en  $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidos durante el experimento de hojas jóvenes en Peñalsordo.

Se puede observar cómo, a medida que pasaba el tiempo del experimento en un ambiente con poco MGT en la atmósfera, las hojas reemitían el mercurio que tenían previamente acumulado (figura 39). Al analizar las muestras de olivo que existen en Peñalsordo, se ha comprobado que los valores están alrededor de  $29,6 \text{ ng g}^{-1}$  de mercurio en promedio, lo que demuestra que la desorción es reversible, ya que en los datos obtenidos de los análisis realizados a los olivos que previamente han estado en Almadenejos y después se han trasladado a Peñalsordo, se observa que, al producirse la desorción, los valores se sitúan en ese rango. Es importante también destacar que las plantas que menos mercurio tenían al principio (las regadas con  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  en la figura 39) fueron las que menos mercurio tenían al final del experimento. Este hecho de observación se repite para el resto de las plantas, puesto que al principio el orden de mayor concentración de mercurio a menor era Riego 0 > Riego 50 > Riego 5 > Riego 500 y al final del experimento este orden se mantuvo. También es destacable que en el transcurso del experimento se volvieron a observar oscilaciones que parecen responder a un intercambio de mercurio con la atmósfera, de manera que la desorción no parece ser un fenómeno exclusivo y constante durante este experimento y que también se produjeron periodos de absorción de mercurio.



**Figura 39:** Concentraciones de mercurio en hojas de olivo durante el experimento de desorción en Peñalsordo.

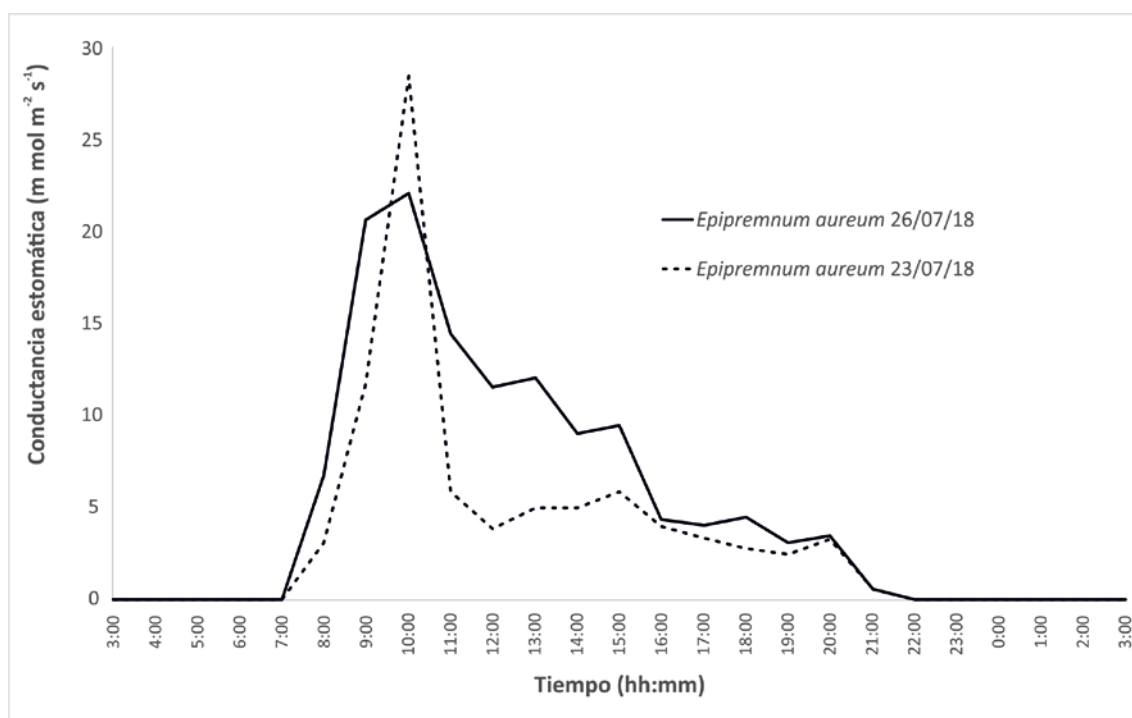
Las conclusiones preliminares de este apartado confirman la existencia de los procesos de desorción de mercurio previamente captado por una planta, y por lo tanto el carácter reversible de los procesos de acumulación de mercurio en plantas. El factor principal en este proceso es la presencia (en este caso ausencia) de mercurio en el medio atmosférico, independientemente de la dinámica micrometeorológica y de la fisiología de la planta.

### 3.5. Quinto experimento: absorción/desorción de mercurio en ambiente confinado

#### 3.5.1. Fase previa.

Durante tres meses, la planta elegida estuvo en una atmósfera con altas concentraciones de mercurio gaseoso ( $200-300 \text{ ng m}^{-3}$ ). Tras este periodo de tiempo se analizó una muestra de hoja, para controlar el estado de absorción de mercurio en el que se encontraba la planta, hallándose una concentración de  $245 \text{ ng g}^{-1}$  en peso húmedo. Es un valor comparable a los que se han encontrado al finalizar el experimento de olivos en Almadenejos (apartado 3.1.).

También se comprobó el ciclo de respiración de la planta mediante la monitorización del ciclo de conductancia estomática (figura 40). Se observó que este ciclo aparece controlado por el ciclo de luz solar, comenzando a ser ascendente a partir de las 07:00 am, con un máximo a las 10:00; posteriormente hubo un segundo ascenso moderado en el periodo de las 14:00-15:00, y un ascenso mínimo a las 20:00, llegando a un descenso conforme iba anocheciendo, llegando a valores de conductancia nulos a las 22:00.



**Figura 40:** Evolución diaria de la conductancia estomática de la planta durante dos días del mes de julio de 2018.

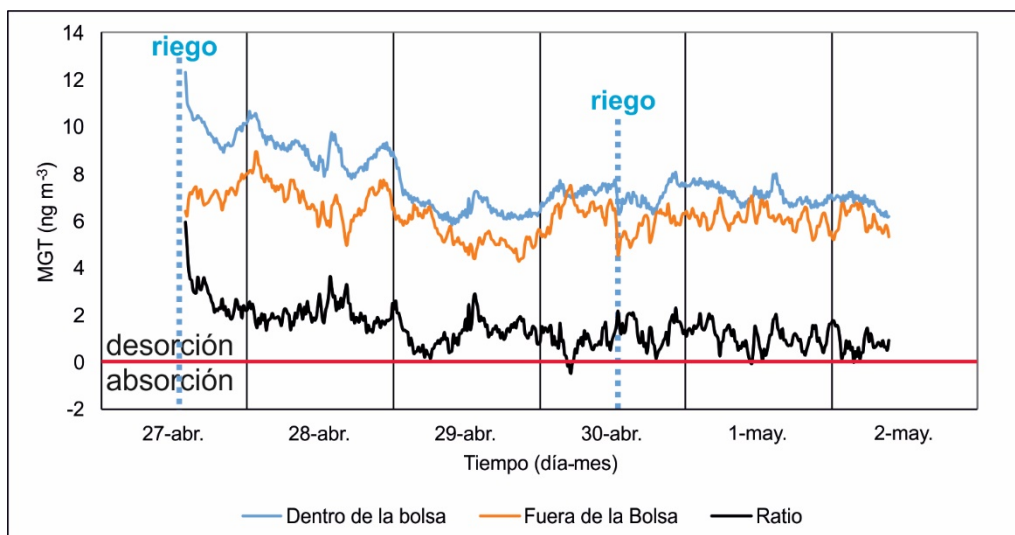
### 3.5.2. Fase de desorción inicial.

Para realizar esta fase, la planta se trasladó a la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (Ciudad Real), concretamente al laboratorio de Cultivos Leñosos, ya que este está libre de altas concentraciones de MGT, como se pudo verificar previamente con medidas mediante el analizador LUMEX RA-915M. Desde el 27 de abril hasta el 01 de junio de 2018 (35 días) se procuró que la planta recibiera luz indirecta del día, para que no estuviera al sol en ningún momento. Se utilizó una bomba de aire comercial para introducir en la bolsa el mismo caudal de aire que el Tekran extraía de forma continua ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ) y así poder mantenerla con volumen de aire constante en su interior, mientras el contenido en mercurio de este aire que se introducía en la bolsa era monitorizado por el equipo analítico Lumex (figura 41).



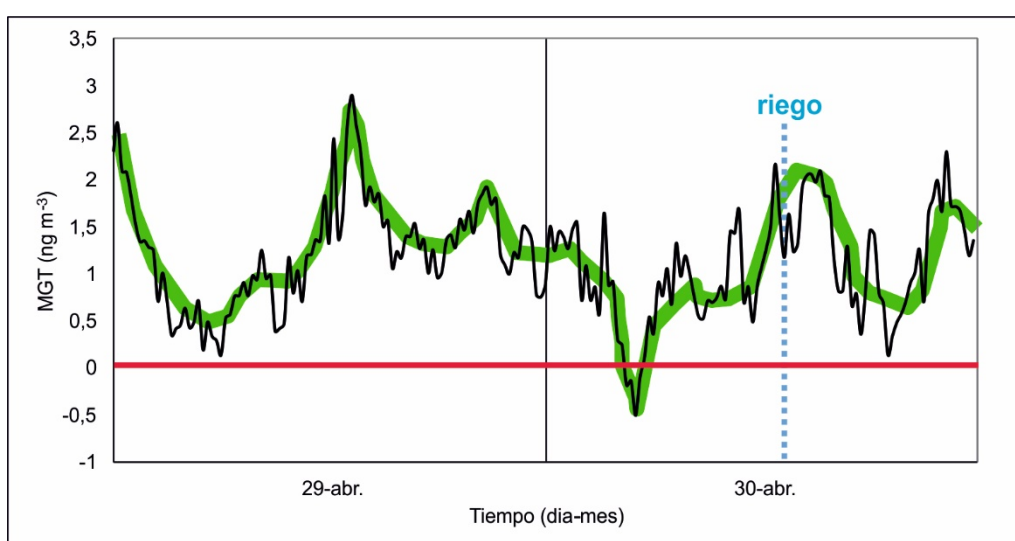
**Figura 41:** Estado inicial del experimento en el laboratorio de Cultivos Leñosos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (Ciudad Real).

En la figura 42 podemos observar el mercurio previamente acumulado en las hojas durante la primera semana de desorción. Vemos que la tendencia general es descendente, partiendo de un estado inicial en el que la emisión se produce durante todo el día, se observan valores máximos de unos  $13 \text{ ng m}^{-3}$  durante el primer día, mientras que a lo largo del experimento los valores van descendiendo. A partir del día 28 de abril el ciclo diario sigue siendo de emisión neta, aunque muestra un descenso hacia zonas de absorción neta entre las 05:00 y las 06:00, y un máximo de emisión entre las 13:30 y 14:30. El riego de la planta el 30 de abril produjo un aumento de la humedad relativa en el laboratorio y un descenso tanto en las concentraciones de dentro como fuera de la bolsa, siendo mayor fuera de la bolsa. Este descenso puede ser causado por deposición húmeda, al ascender de forma brusca la humedad relativa fuera de la bolsa por evaporación del agua de la maceta y dentro de la bolsa por intercambio de agua a través del aparato estomático de la planta. Hay que recordar que a mediodía la planta estaba todavía con los estomas abiertos e intercambiando gases.



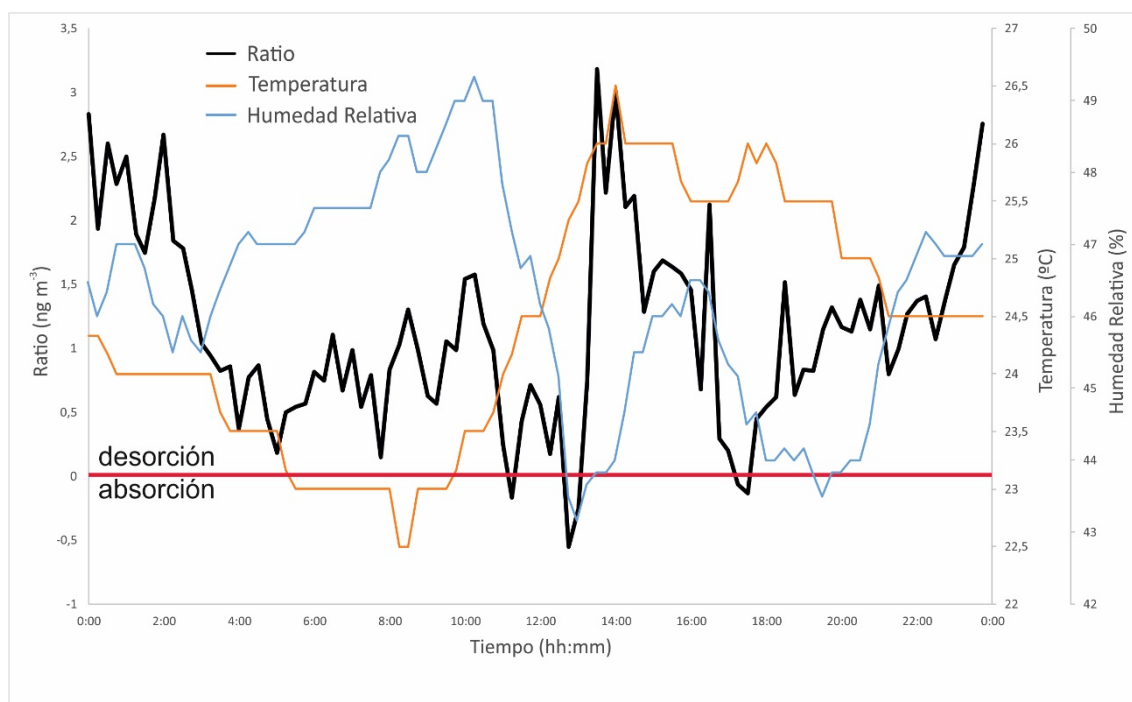
**Figura 42:** Evolución temporal del mercurio medido dentro y fuera de la bolsa, y la diferencia entre ambos (ratio). La línea roja separa los valores en los que la planta emite mercurio (superiores) o lo absorbe (inferiores).

Al observar los valores correspondientes a los días 29 y 30 de abril en la figura 43, observamos un mínimo diario entre las 05:00 y las 06:00 horas y un máximo entre las 13:30 y las 14:30 horas. El efecto que tiene el riego en el máximo es de descenso hacia absorción, un dato explicable en términos de ascenso de deposición húmeda por ascenso de humedad relativa en la atmósfera confinada de la bolsa. Durante estos dos días, vemos un ascenso moderado de las emisiones entre las 20:30 y las 22:30 horas. Durante este periodo, la radiación solar es nula, el proceso de fotosíntesis de la planta está interrumpido, los estomas están cerrándose y el intercambio de mercurio llegando a cero, sí se produce un descenso de la temperatura. La tendencia de los dos días es descendente, tanto en el mínimo de la noche, como en el máximo del mediodía o el aumento moderado del anochecer son menores el 30 de abril respecto del día anterior.



**Figura 43:** Evolución del ratio de mercurio gaseoso en la bolsa durante dos ciclos diarios, 29 y 30 de abril de 2018. Se ha dibujado a mano alzada una línea promedio (de color verde) de los valores de mercurio gaseoso.

El experimento de desorción continuó de forma continua y sin alteraciones en las condiciones hasta el 1 de junio. Durante la segunda semana los datos del exterior de la bolsa se perdieron debido a un fallo en el datalogger del equipo utilizado. Sin embargo, observamos en la figura 44 que diez días después de los correspondientes al gráfico de la figura 43, el patrón de desorción y su magnitud se mantuvieron similares. En dicha figura observamos que el descenso se produjo en el periodo de las 04:00-06:00 horas, y el máximo se volvió a registrar en el periodo de las 13:30-14:30 horas, observándose un ascenso en la desorción al término del día, obteniendo la máxima en la última hora del día. La gran diferencia se observó en el periodo de las 12:00-13:00 horas, donde se produjo un descenso hasta valores de absorción neta de mercurio. Los parámetros meteorológicos mostraron un descenso de la humedad relativa coincidente con este paso a valores de absorción. La humedad relativa está involucrada en el ciclo de respiración de la planta, puesto que el intercambio de líquidos se estima mayor que en el intercambio de gases y se ha descrito que valores muy bajos de humedad relativa pueden decrecer al ritmo de respiración, e incluso cerrar los estomas para evitar la excesiva pérdida de agua.

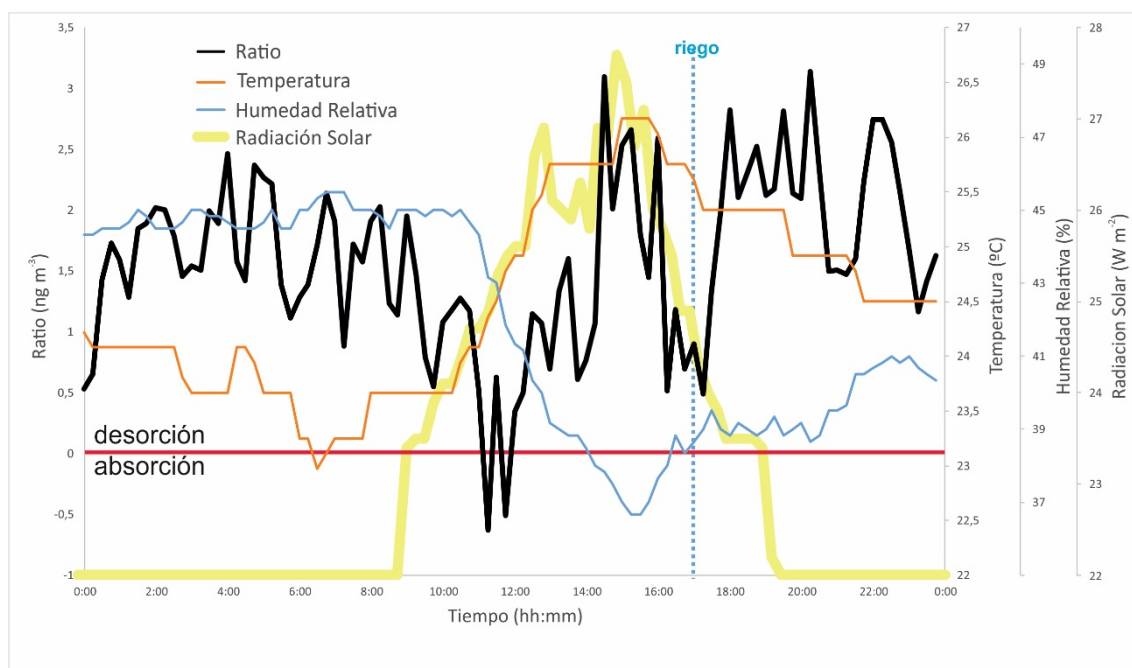


**Figura 44:** Evolución del flujo de mercurio, de la temperatura y de la humedad relativa durante el día 9 de mayo de 2018.

En la figura 45 observamos el ciclo diario de otro día (11 de mayo), y podemos observar que existen menos variaciones nocturnas de humedad relativa, pero similares variaciones de temperatura y riego (17:00 horas). Se observa que el descenso en la madrugada (04:00-06:00 horas) no se produce en este caso, por lo que es probable que el factor predominante de este descenso fuera la humedad relativa, más estable e inferior en esta noche. Sin embargo, el descenso del periodo 12:00-13:00 horas sigue produciéndose, con condiciones similares de temperatura y humedad relativa. Produciéndose también el máximo en el periodo 13:30-14:30 horas y coincidente con el ciclo de luz solar del laboratorio, sobre todo en el descenso de la radiación solar (en el ascenso coincide con el ascenso de la temperatura), por lo que el ciclo de

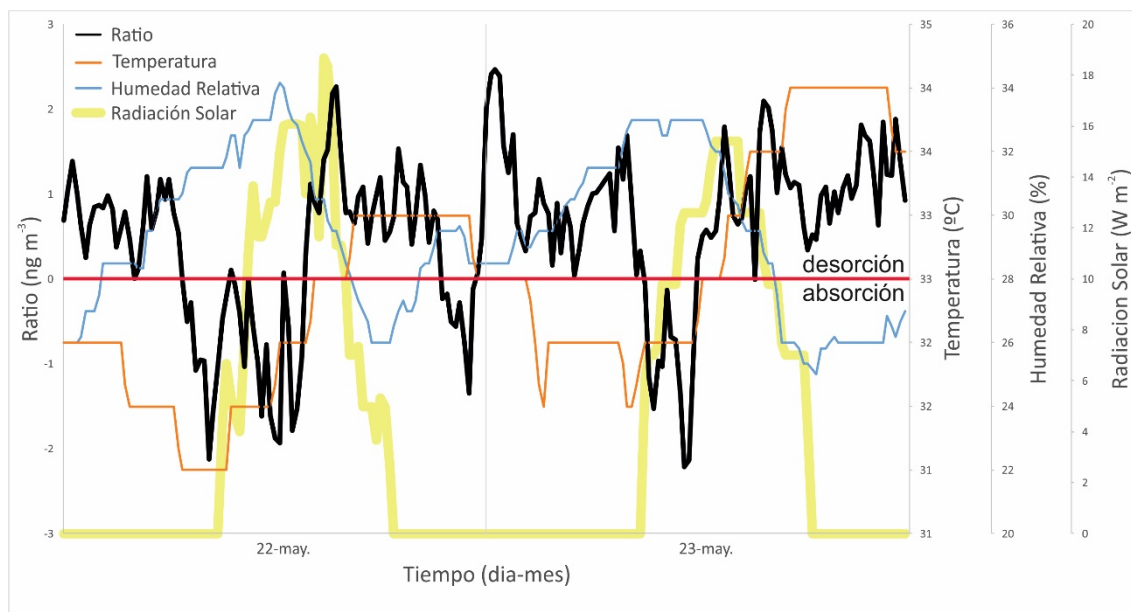


respiración y la conductancia estomática parecen ser el factor principal en este máximo de desorción. El segundo ascenso secundario al anochecer alcanza valores de desorción más elevados, coincidiendo con el periodo de riego de la planta y valores más bajos de humedad relativa en este periodo. De estas observaciones se puede deducir que humedades relativas más bajas pueden ser un factor que active la desorción del mercurio durante el periodo nocturno, tanto al comienzo como al final del día, mientras que el máximo de desorción aparece controlado por el ciclo diurno de luz solar. El punto de absorción coincide siempre con las primeras horas del ciclo de respiración de la planta y es más importante que diez días antes (figuras 42 y 43).



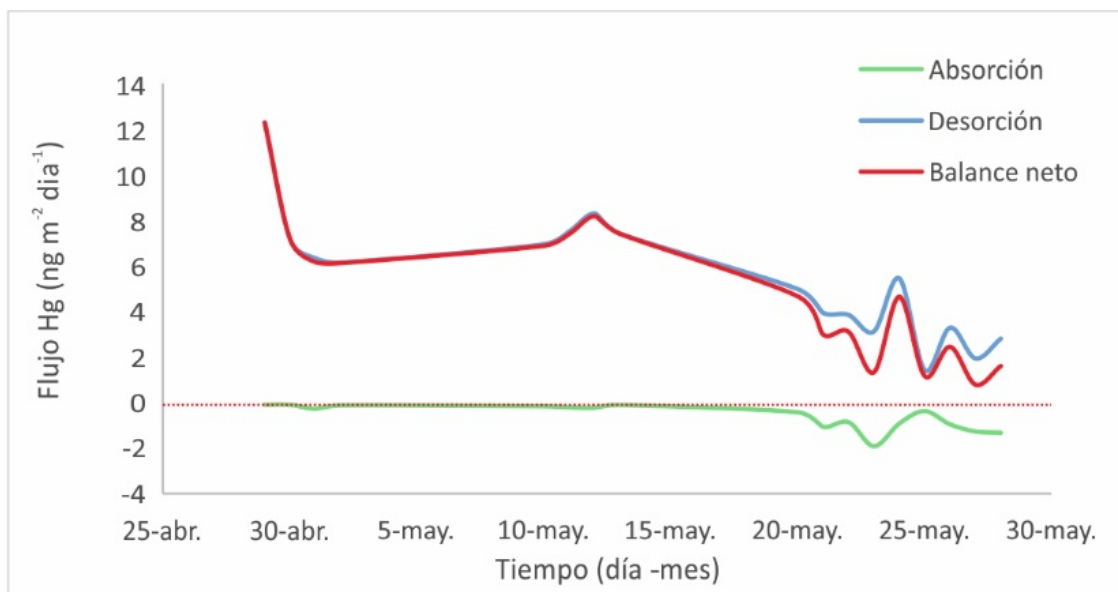
**Figura 45:** Evolución del flujo de mercurio, temperatura, humedad relativa y radiación solar durante el día 11 de mayo de 2018.

En días posteriores (figura 46) observamos un decrecimiento de la tasa de absorción de las hojas de *Epipremnum aureum* L&A., hasta tal punto que la desorción y la absorción parecen estar alcanzando el equilibrio. La estructura de mínimos y máximos del periodo de desorción neta ya no se mantiene en esta etapa de equilibrio, no existe el descenso de la madrugada, ni máximo de las 13:30-14:30, esta franja de tiempo se ha sustituido por una tendencia hacia la absorción durante el primer periodo de conductancia estomática activa y de desorción en la segunda parte del ciclo de respiración. Antes y después de que los estomas estén abiertos la tendencia general es hacia la desorción. Stamenkovic y Gustin (2009) explicaron algo similar en los episodios de desorción (emisión) procedentes del mercurio que se encontraba absorbido en la cutícula de la hoja.



**Figura 46:** Evolución del flujo de mercurio, temperatura, humedad relativa y radiación solar durante los días 22 y 23 de mayo de 2018.

En la figura 47 se muestra la evolución de las tasas de adsorción y desorción a lo largo de los 35 días de duración del experimento. Se observa que la desorción alcanzó sus máximos al principio del experimento, con tasas de absorción nulas durante casi 20 días. En la última fase del experimento, las hojas comenzaron a estar en equilibrio con el mercurio en la atmósfera de la bolsa y comenzaron a tener un intercambio de absorción-desorción continuo. Es destacable la falta de gradación o linealidad en la desorción desde el principio del experimento. Esto puede ser debido a un efecto de los dos periodos de muestreo que se perdieron por fallo en el datalogger del equipo, que hace aparecer dos líneas rectas en el gráfico que bien pudieran ser oscilaciones como las que se reconocen al final del gráfico. A partir de este gráfico se ha calculado la cantidad de mercurio por unidad de área de hoja del balance neto, obteniéndose la cifra de  $167 \text{ ng m}^{-2}$ , lo que supone una cantidad total de  $23,21 \text{ ng}$  de mercurio emitidos durante todo el experimento.



**Figura 47:** Evolución del flujo de mercurio durante todo el tiempo del experimento.

### 3.5.3. Fase de absorción.

En esta parte del experimento se cambiaron las condiciones de valores de fondo de mercurio atmosférico en la bolsa, a valores crecientes aportados por fuentes discretas de mercurio. La disposición del experimento se muestra en la figura 48. El principal cambio consistió en el confinamiento de la bomba en una caja de cartón sellada, junto con la fuente de emisión de mercurio. La caja era opaca para evitar cambios en la radiación solar, así como de cambios de temperatura que pudieran afectar a la emisión por la fuente. Con estas medidas se pretendía mantener las emisiones de la fuente constantes durante al menos una semana de recogida de datos.

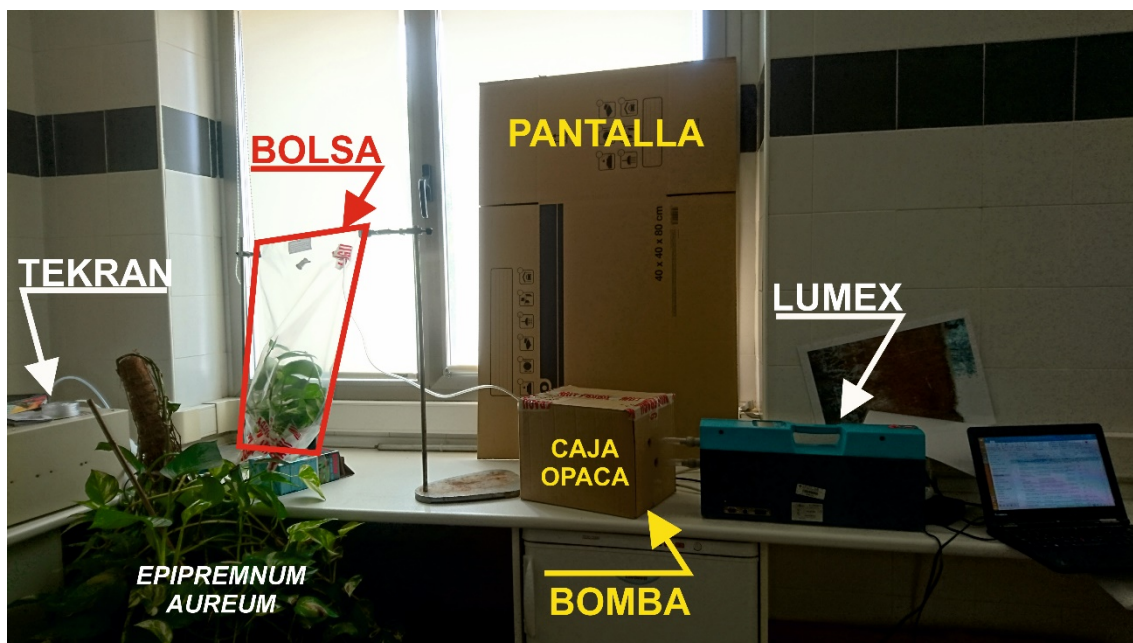
Se realizaron 4 experiencias de absorción:

La primera, suministrándole una corriente constante de  $24 \text{ ng m}^{-3}$  de mercurio gaseoso.

La segunda, suministrando una corriente de  $37 \text{ ng m}^{-3}$ .

La tercera, con una corriente de  $160 \text{ ng m}^{-3}$ .

La cuarta, con una corriente de  $160 \text{ ng m}^{-3}$  pero manteniendo la parte de la planta en el interior de la bolsa en total oscuridad.



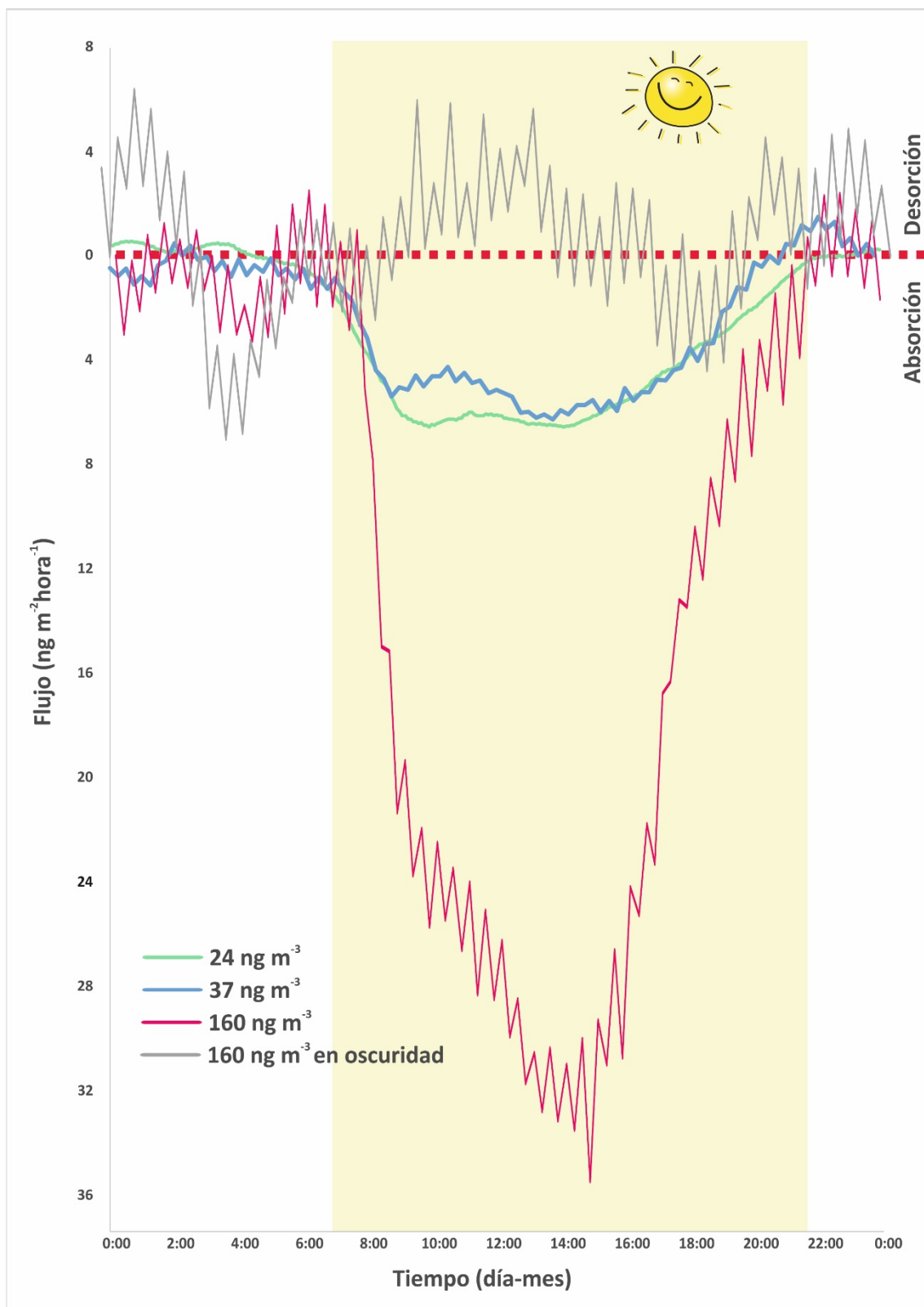
**Figura 48:** Disposición del experimento en su fase de absorción.

En la figura 49 se muestran los resultados de las cuatro experiencias. Los resultados más evidentes son la gran similitud de los gráficos de la planta expuestas a  $24 \text{ ng m}^{-3}$  y a  $37 \text{ ng m}^{-3}$ , aunque mostrando más dispersión de los datos la que estaba expuesta a concentraciones más elevadas.

Cuando a la planta se la expone a cantidades muy elevadas de mercurio gaseoso ( $160 \text{ ng m}^{-3}$ ), el perfil es marcadamente más amplio. Estos tres perfiles son muy similares en términos de evolución diaria, comenzando a absorber mercurio gaseoso con las primeras luces del día y concluyendo el ciclo de absorción cuando termina el ciclo de luz solar. Es evidente que el ciclo de fotosíntesis del *Epipremnum aureum* expuesto en la figura 40 es el factor principal en el ciclo de absorción de la planta. Más aún si se tiene en cuenta la diferencia entre el ciclo a  $160 \text{ ng m}^{-3}$  con luz y el realizado en total oscuridad. Cuando la planta no detecta luz solar al comienzo del día no comienza el ciclo de absorción, si no que absorbe y desorbe en pequeñas concentraciones a intervalos dependientes de otros factores (temperatura, humedad relativa, punto de rocío...).

En una jornada de 24 horas, las cantidades totales de mercurio absorbido por superficie de hoja fueron:

- $202,8 \text{ ng m}^{-2}$  cuando la planta estuvo expuesta a  $24 \text{ ng m}^{-3}$ .
- $125,9 \text{ ng m}^{-2}$  cuando la planta estuvo expuesta a  $37 \text{ ng m}^{-3}$ .
- $1067,9 \text{ ng m}^{-2}$  cuando la planta estuvo expuesta a  $160 \text{ ng m}^{-3}$  con luz solar.
- $49,2 \text{ ng m}^{-2}$  cuando la planta estuvo expuesta a  $160 \text{ ng m}^{-3}$  en total oscuridad.



**Figura 49:** Ciclo diario de absorción/desorción del *Epipremnum aureum* expuesto a cantidades crecientes de mercurio gaseoso (24, 37 y 160 ng m<sup>-3</sup>) con luz solar y expuesta a 160 ng m<sup>-3</sup> en total oscuridad.

#### 3.5.4. Discusión.

*Epipremnum aureum* ha demostrado distintos patrones en el ciclo de desorción-absorción diaria, llegando a alcanzar en la fase de desorción  $14\text{-}196\text{ ng m}^{-2}\text{ día}^{-1}$ , mientras que en la fase de absorción obtuvo  $170\text{-}1341\text{ ng m}^{-2}\text{ día}^{-1}$ .

Stamenkovic y Gustin (2009) hicieron referencia a otras plantas, donde observaron que la concentración de mercurio en el aire tenía un efecto significativo en la interfaz hoja-atmósfera, mientras que en nuestro experimento se observó un aumento proporcional a la presencia de MGT, desde los niveles anteriores en el experimento de desorción a niveles superiores a  $160\text{ ng m}^{-3}$  en el 3º y 4º experimento de absorción (apartados 3.3 y 3.4). Kothny (1973) describió por primera vez un impulso de emisión de mercurio de vegetación después de la salida del sol; esta idea fue confirmada posteriormente por otros autores describiendo concentraciones de mercurio neto en tiempo diurno (Yu et al., 2018; Stamenkovic y Gustin, 2009).

Este trabajo presenta los primeros datos sobre el ciclo de desorción diario después de un ciclo de absorción intenso, utilizando una planta de interior común (*Epipremnum aureum*) previamente enriquecida con la absorción de Hg procedente de una atmósfera enriquecida de forma natural. Los ciclos de desorción tuvieron la máxima coincidencia con los valores máximos de radiación solar y conductancia estomática; sin embargo, se identifican sorprendentemente valores menores de desorción en periodos nocturnos, cuando las condiciones de absorción se producen después del amanecer. Estos ciclos son más complejos que los descritos por Yu et al. (2018) y Luo et al. (2016).

Es importante tener en cuenta que los datos presentados en este estudio no se corresponden con las emisiones en un contexto de cambio continuo, sino a una desorción posterior a una alta absorción de mercurio en las hojas y muy baja concentración de MGT en la atmósfera.

La existencia de desorción en período nocturno indica que hay diferentes rutas estomáticas, lo que favorece la emisión de mercurio en la hoja. Rutter et al (2011) estimaron que el mercurio iba directamente al interior de la hoja (96%) y sólo una parte (4%) permanecía en la cutícula de la hoja. Estos autores consideran que el 96% del mercurio permanecerá en la hoja como mercurio no desorbible y sólo el 4% se reemite a la atmósfera si las condiciones son favorables.

Como podemos observar en la figura 42, la emisión de este mercurio superficial puede ocurrir en la primera etapa del ciclo de desorción; después de esto, el mercurio desorbido puede proceder tanto de la cutícula como del mercurio del interior de la hoja. Estos datos coinciden con lo previamente descrito por Naharro et al. (2018) y en el apartado 3.5. de esta tesis, describiendo que casi un 37% del mercurio captado en olivos puede desorberse en un área prístina, una proporción considerablemente mayor que la fracción minoritaria descrita por Rutter et al. (2011). Estos datos limitan el carácter no reversible del proceso de captación de mercurio, lo que sugiere que una fracción del mercurio “inmovilizado” en el interior de la hoja podría emitirse si los niveles de MGT en la atmósfera disminuyeran drásticamente (Naharro et al., 2018). Esta “inmovilización” del mercurio en el interior de la hoja no es solo como mercurio oxidado, sino también como mercurio metabolizado, unido a biotioles o proteínas (complejos de cisteína, Carrasco-Gil et al., 2013); de este modo los procesos metabólicos pueden liberarse de estos compuestos, favoreciendo la reemisión de mercurio. Por ejemplo, en algunos de

estos casos, el mercurio se puede unir a proteínas de membrana de plasma tales como acuaporinas (Zhang & Tyerman, 1999), moléculas implicadas en los movimientos del agua entre las células, susceptible de actuar como una forma de transporte de mercurio en el exterior de la hoja. Otra vía por donde emitir el mercurio puede ser la fracción del elemento unida a fitoquelatinas o cisteína, que pueden estar involucradas en el transporte del metal de larga distancia por el interior de la planta, partiendo desde la raíz o viceversa (Gong et al., 2003), actuando como proceso de movilización. La relación estadística encontrada entre los datos de desorción y la temperatura, pueden confirmar el papel de estas vías de transporte en el proceso de reemisión de mercurio.

De todos modos, la ruta de salida del mercurio desde las hojas durante periodos nocturnos, con los estomas completamente cerrados, es un tema que está siendo estudiado, aunque aún no tiene aún una explicación adecuada.

Por otra parte, el proceso de absorción en la planta *Epipremnum aureum* ha mostrado un ciclo diario para todas las condiciones experimentadas, con la captación de mercurio variando durante diferentes horas, pero coincidiendo con la radiación solar y la conductancia estomática, mientras que el flujo de mercurio es nulo durante las horas nocturnas, como otros autores han descrito para diferentes especies de plantas (Erickson et al., 2003; Stamenkovic y Gustin 2009).

Los factores que afectan al proceso de absorción habrían sido la presencia de MGT en la atmósfera y la conductancia estomática.

El primer factor actúa como regulador de la capacidad de absorción proporcional, siendo mayor cuando más bajos son los niveles de MGT y decreciendo cuando los valores de MGT son elevados. La implicación de este hallazgo es que la capacidad de absorción del mercurio puede tender a un límite máximo, dependiendo de las especies de plantas.

El segundo factor constituye la vía única de mercurio para poder entrar en el tejido de la hoja. La humedad relativa puede ser un factor secundario, modificando los niveles de MGT por deposición húmeda y la conductancia estomática por los cambios en el equilibrio del agua entre las células de la planta y el aire del ambiente.

Es importante denotar que no se ha encontrado absorción nocturna, por lo que la vía cuticular puede quedar en entredicho, y si no desmentida, al menos no confirmada con estos datos en *Epipremnum aureum*.

La combinación de estos dos procesos, absorción y desorción en la planta estudiada, ofrece por primera vez una visión completa de las posibilidades que tiene la planta de actuar como fuente de mercurio atmosférico, aunque cambien las condiciones ambientales. El proceso de absorción es más rápido que el proceso de desorción, e implica la conductancia estomática, los niveles ambientales de MGT y la humedad relativa como factores limitantes, mientras que el proceso de desorción parece ser más complejo, implicando no sólo la conductancia estomática y la temperatura, sino también, probablemente, la concentración de CO<sub>2</sub>, las células de los estomas y la especiación de mercurio en el interior de la hoja, entre otros.

La característica de los procesos reversibles-no reversibles del proceso descrito en la literatura científica debe de ser reconsiderado, teniendo en cuenta que el mercurio en el interior de la hoja se puede emitir si los cambios en las condiciones ambientales son suficientes para favorecerla. También son importantes los cambios que pueden producir las emisiones de mercurio, llegando a disminuir los niveles de MGT. Este efecto puede ser relevante en el contexto actual del cambio climático y la reducción de las emisiones antropogénicas de mercurio.

### 3.5.5. Conclusiones parciales

Las conclusiones del trabajo experimental aquí descrito son las siguientes:

Los ciclos diarios de conductancia estomática difieren en función de las especies de las plantas, mostrando valores positivos en ciclos nocturnos en las plantas, exceptuando nuestra planta modelo (*Epipremnum aureum*). Los valores de conductancia estomática en la planta modelo están comprendidos entre  $3.7\text{--}5.5 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mientras que en otras plantas estudiadas los niveles son superiores ( $10.1 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de *Begonia acutifolia* J. y  $43.5 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de *Vitis vinifera* L.).

El mercurio acumulado en la planta puede ser desorbido cuando disminuyen los niveles de MGT hasta a ritmos de  $14\text{--}196 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , con ciclos que muestran los mayores valores de intercambio de mercurio coincidentes con los valores de conductancia estomática superiores, durante las horas nocturnas, pero que muestran las tendencias a valores de absorción durante las horas diurnas.

Los valores de absorción de mercurio se sitúan entre  $170$  y  $1341 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ; estos valores muestran el ciclo diario de conductancia estomática en los periodos de absorción, y dichos valores son siempre positivos. Las cantidades promedio totales de Hg absorbidas por la superficie de la hoja en un recorrido de 24 horas fueron las siguientes:  $269,5 \text{ ng m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (TGM =  $24 \text{ ng m}^{-3}$ );  $352,5 \text{ ng m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (TGM =  $37 \text{ ng m}^{-3}$ );  $1079,6 \text{ ng m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) y  $49,2 \text{ ng m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) en la oscuridad total.

El proceso de absorción incluye factores como la conductancia estomática, niveles MGT y humedad relativa, mientras que el proceso de desorción es más complejo, en el que además de implicar la conductancia estomática y la temperatura, también depende, con toda probabilidad, de la concentración de  $\text{CO}_2$  y de la especiación de mercurio en el interior de la hoja.

El proceso de captación reversible/no reversible de mercurio debe reconsiderarse, teniendo en cuenta que el mercurio en el interior de la hoja se puede emitir si los cambios en las condiciones ambientales lo favorecen.

Dadas las tendencias actuales de reducción de emisiones de mercurio antropogénico, la reemisión de mercurio captado por las plantas podría representar una fuente secundaria de MGT de relativa importancia.



## 4. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis ha estudiado los flujos de mercurio en la interfase entre tres medios: el suelo, las plantas y la atmósfera, demostrando que:

### 4.1 Conclusiones parciales

Las conclusiones parciales del primer experimento son las siguientes:

- El mercurio acumulado en las hojas de las plantas varía en términos de concentración según las condiciones atmosféricas y la presencia de mercurio atmosférico.
- Distintos individuos de la misma especie vegetal presentan distintas capacidades de captación de mercurio en similares condiciones.
- El intercambio de mercurio gaseoso a través de las hojas es continuo y dependiente de la presencia de mercurio atmosférico al que está expuesta la planta.

Las conclusiones parciales del segundo experimento son las siguientes:

- El proceso de acumulación de mercurio en las hojas de las plantas estudiadas se realiza por vía aérea.
- El mercurio que pueden obtener las plantas varía según las condiciones atmosféricas y las concentraciones de mercurio atmosférico a las que se las sometan.
- Distintos ejemplares de plantas estudiadas presentan distintas tasas de absorción de mercurio bajo similares condiciones externas.
- El intercambio de mercurio gaseoso a través de las hojas es continuo y dependiente del contenido de mercurio en la atmósfera en la que está la planta.

Las conclusiones parciales del tercer experimento son las siguientes:

- La captación radicular existe, al menos si a la planta se le proporciona mercurio de forma disponible en el suelo a través del agua de riego.
- El mercurio añadido en el agua de riego es acumulado de forma más eficaz en la raíz que en el suelo.
- El mercurio acumulado en el suelo del experimento procede tanto del agua de riego como del mercurio atmosférico.
- Las plantas no regadas con mercurio pueden captar el elemento directamente de la atmósfera.
- La presencia de materia orgánica en el suelo le proporciona capacidad de absorción de mercurio atmosférico.
- El mercurio en el suelo procedente de la atmósfera ( $\text{Hg}^0$ ) es menos lixiviable que el mercurio aportado en el agua de riego ( $\text{Hg}^{2+}$ ).
- El mercurio en el suelo aparece solo como mercurio orgánico, independientemente de que el origen sea  $\text{Hg}^0$  o  $\text{Hg}^{2+}$ .
- En el suelo, tanto el  $\text{Hg}^0$  como el  $\text{Hg}^{2+}$  son fijados por los ácidos húmicos.

Las conclusiones parciales del cuarto experimento son las siguientes:

- Se ha confirmado la desorción de mercurio previamente captado por la planta y, por lo tanto, el carácter reversible de los procesos de acumulación de mercurio en plantas.

Las conclusiones parciales del quinto experimento son las siguientes:

- El proceso de absorción depende de la conductancia estomática, niveles de mercurio gaseoso total y humedad relativa, mientras que el proceso de desorción es dependiente de la conductancia estomática, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub> y de la especiación de mercurio en el interior de la hoja.
- El proceso de captación reversible/no reversible de mercurio debe reconsiderarse, teniendo en cuenta que el mercurio en el interior de la hoja se puede emitir si los cambios en las condiciones ambientales lo favorecen.
- Dadas las tendencias actuales de reducción de emisiones de mercurio antropogénico, la reemisión de mercurio captado por las plantas podría representar una fuente secundaria de mercurio gaseoso total de relativa importancia.

#### **4.2 Conclusiones generales**

- Los procesos de absorción radicular de mercurio procedente del suelo existen, aunque son minoritarios y limitados por la disponibilidad y especiación del mercurio.
- Los procesos de absorción directa de mercurio procedente de la atmósfera por la parte aérea de una planta existen y se pueden considerar como los mecanismos preferenciales de captación de mercurio por una planta.
- Se ha probado la existencia de correlación entre el mercurio disponible para la planta en el suelo y el mercurio captado por la parte aérea. Además, se ha estimado que este proceso es de captación directa desde la atmósfera y que las correlaciones no corresponden a una relación de causalidad directa, sino a la relación indirecta entre el mercurio disponible en el suelo y el mercurio que el suelo es capaz de emitir en condiciones naturales.
- Los procesos de absorción de mercurio son en parte reversibles, y se han confirmado los procesos de desorción. El principal factor en este proceso es la presencia de bajas concentraciones de mercurio en el medio atmosférico.
- El mercurio absorbido por la planta está formando parte de moléculas orgánicas, o se presenta adsorbido por éstas.
- Los ciclos de fotosíntesis de las plantas controlan los tiempos de absorción y desorción de mercurio en la parte aérea de las plantas en un ciclo diario, siendo los procesos de absorción mucho más eficientes en términos de tasa de mercurio absorbido por unidad de tiempo, que los de desorción.

## 5. Referencias Bibliográficas.

Adriano, D.C (2001) Mercury. En: Trace elements in the Terrestrial Environments. 2nd Edition. Springer, New York EEUU, pp. 411-458.

Ahammad, S. J., Sumithra, S., & Senthilkumar, P. 2018. Mercury uptake and translocation by indigenous plants. *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(1), 1-12.

Alloway, BJ (1995) Heavy metals in soils, 2nd ed. Chapman and Hall, London.

Almansa, E. (2012) El real sitio de Almadenejos en Ciudad Real (siglos XVIII-XIX) en un contexto minero-metalúrgico. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España.

Amorós, J., Esbrí, J. M., García-Navarro, F. -, Pérez-de-los-Reyes, C., Bravo, S., Villaseñor, B., & Higuera, P. (2014). Variations in mercury and other trace elements contents in soil and in vine leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 773-777.

Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M. & Tatin-Froux, F. 2016. "Mercury uptake into poplar leaves". *Chemosphere*, 146, 1-7.

Bargagli, R. 1995. The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. *Science of the Total Environment*, 176, 121–128.

Barquero, J.I., Rojas, S., Esbrí J.M., García-Noguero, E.M., Higuera, P. (2017). Factors influencing mercury uptake by leaves of stone pine (*Pinus pinea* L.) in Almadén (Central Spain). *Environmental Science and Pollution Research* (aceptado pendiente de publicación).

Barranco, D. Fernández-Escobar, R. Rallo, L. (1996). El cultivo del olivo. Barranco, D. Fernández-Escobar, R. Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Mundi-Prensa. 22, 4833–4841.

Barranco, D. (2017). Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo Barranco, D.; Fernández-Escobar R.; Rallo L. (eds.), MundiPrensa, Madrid. pp 78.

Beauford, W., Barber, J., and Barringer, A.J., 1977. Uptake and distribution of Mercury withing higher plants. *Physiologia Plantarum* 39, 261-265.

Berman, E, 1980. Toxic Metals and their Analisis, Ed. Heyden and Son, International topics in Science. London, England. 293 pp.

Biester, H., Muller, G., Scholler, H.F. 2002. Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants. *The Science of the Total Environment* 284, 191-203.

Blondel, J., Aronson, J., 1999. Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press. New York. 352 pp.4

Boening, D.W., 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40, 1335-1351.

Bourgoin, M., Laurence, Quiroga, I., Alanoca, L., Flores, L., Chincheros, J. (2001) El mercurio en la amazonia boliviana: síntesis del conocimiento sobre la contaminación por mercurio en aguas, sedimentos y peces del río Beni y sus tributarios, impactos sobre las poblaciones ribereñas; C 010057498.

Bravo L. Plantas medicinales. Madrid: Elsevier España; 2003. p. 235-7.

Bravo, S., Amorós, J.A., Higuera, P.L., García, F.J., Pérez-de los Reyes, C., Sánchez.M., Estroncio (Sr) acumulado en hojas de vides (Vitis vinifera L.) en Castilla- La Mancha. I Jornada del grupo de viticultura y enología (2014)

Burzynski, M. y A. Zurek. 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica* 45, 239-244.

Campos, J., Esbrí, J.M., Madrid, M.M., Naharro, R., Peco, J., García-Noguero, E.M., Amorós, J.A., Moreno, M.M., Higuera P. 2018. Does mercury presence in soils promote their microbial activity? The Almadenejos case (Almadén mercury mining district, Spain). *Chemosphere*, 201, 799-806.

Carmona, M., Llanos, W., Higuera, P., Kocman, D. (2013) Mercury emissions in equilibrium: A novel approach for the quantification of mercury emissions from contaminated soils. *Anal Methods* 5(11):2793-2801

Carrasco, J., Manzanares, P., Tallos and Recreo, F., 2001. Bioremediation and Economical Renewal of Industrially Degraded Land Using Biomass Fuel Crops. *BIORENEW*. European Commission DGXII, ENV4-CT97-0610.

Carrasco-Gil, S., Siebner, H., Leduc, D.L., Webb, S.M., Millán, R., Andrews, J.C., Hernández, L.E. (2013). Mercury localization and speciation in plants grown hydroponically or in a natural environment. *Environmental Science and Technology*, 47(7), 3082-3090.

Castillo, M. (2001). "La amalgamación y Bartolomé de Medina", *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 97 (4).

De Nicola, F., Maisto, G., & Alfani, A. (2003). Assessment of nutritional status and trace element contamination of holm oak woodlands through analyses of leaves and surrounding soils. *Science of the Total Environment*, 311(1-3), 191-203.

Díaz-Arriaga, F. A. (2014). Mercury in ASGM and its impact on water resources used for domestic water supply. [Mercurio en la minería del oro: Impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano] *Revista De Salud Pública*, 16(6), 947-957.

Díez, S., Esbrí, J.M., Tobías, A., Higuera, P., Martínez-Coronado, A. (2011). Determinants of exposure to mercury in hair from inhabitants of the largest mercury mine in the world. *Chemosphere* 84 (5), 571-577.

Egler, S.G., Rodrigues-Filho, S., Villas-Boas, R.C., Beinhof, C. Evaluation of mercury pollution in cultivated and wild plants from two small communities of the Tapajos gold mining reserve, Pará State, Brazil. *Science of the Total Environment*. 2006; 368:424-33.

Ejaz-ul, I., Xiao-e, Y., Zhen-li, H., Qaisar, M. Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *Journal of Zhejiang University Science B*. (2007); 8(1):1-13.

Ericksen, J. A., Gustin, M. S., Schorran, D. E., (...), Lindberg, S. E. & Coleman, J. S. 2003. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmospheric Environment*, 37(12),1613-1622.

Esbrí, J.M., López-Berdonces, M.A., Fernández-Calderón, S., Higuera, P., Díez, S. (2015). Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): An integrated analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 4842-4850.

Esbrí, J.M., Martínez-Coronado, A., Higuera, P.L. (2016). Temporal variations in gaseous elemental mercury concentrations at a contaminated site: main factors affecting nocturnal maxima in daily cycles. *Atmospheric Environment*, 125, 8-14.

Esbrí, J. M., Cacovean, H. & Higuera, P. 2018. Usage Proposal of a common urban decorative tree (*Salix alba* L.) to monitor the dispersion of gaseous mercury: A case study from Turda (Romania). *Chemosphere*, 193, 74-81.

European Standards CSN EN 15852 Ambient air quality – Standard method for the determination of total gaseous mercury. [En línea]. – 2013. – <http://www.en-standard.eu/en-15852-ambientair-quality-standard-method-for-the-determination-of-total-gaseous-mercury..>

Fernández-Patier, R., Ramos-Díaz, M.C., 2011. Informe del Ejercicio de Intercomparación de Mercurio Gaseoso total en aire ambiente “INSITU” (año2011). Ined. Report, Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Área de Contaminación Atmosférica. Ministerio de Economía y Competitividad, España.

Ferrer, A. 2003. Intoxicación por metales. *ANALES Sis San Navarra* 2003: 26 (Supl. 1): 41-153.

FOREGS (2005) Geochemical Atlas of Europe. Part 1: background information, methodology and maps. In: Salminen R (ed) Geological survey of Finland, Espoo, p 526.

Gallardo Millán, J.L; Lorenzo Álvarez, S; Palero Fernández, F. (2012). Guía: Almadén y sus yacimientos de mercurio: 50 años de estudios geológicos. *Geología* 2012. [www.sociedadgeologica.es/archivos\\_pdf/g12triptico\\_creal.pdf](http://www.sociedadgeologica.es/archivos_pdf/g12triptico_creal.pdf)

García-Donas N, 2016. Concentraciones de mercurio y otros metales potencialmente tóxicos en la parcela agrícola y ganadera de Solana de Peñarrubia de Almadén. Proyecto fin de grado de EIMI Almadén.

Gil, C., Ramos-Miras, J., Roca-Pérez, L., Boluda, R. (2010) Determination and assessment of mercury content in calcareous soils. *Chemosphere* 78(4):409-415.

Goldwater, L.J. 1972. *Mercury: A History of Quicksilver*, York Press, Baltimore, pp.270-277.

Gong, J. M.; Lee, D. A.; Schroeder, J. I. (2003) Long-distance root-to shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 10118–10123.

- Göthberg, A. & Greger, M. 2006. Formation of methyl mercury in an aquatic macrophyte. *Chemosphere*, 65(11), 2096-2105.
- Gray, J.E., Higuera, P.L., Hines, M.E., Lasorsa, B.K. (2003). Evaluation of surficial mercury geochemistry in mine waste, sediment, and water at the Almadén mercury mine, Spain. *Geological Socie.*
- Gray, J.E., Hines, M., Higuera, P.L., Adatto, I., Lasorsa, B.K. (2004). Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface water at the Almadén mining district, Spain. *Environmental Science & Technology*, 38, (2004) pp.4285-4292.
- Greger, M. & Dabrowska, B. 2010. Influence of nutrient level on methylmercury content in water spinach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1735-1739.
- Gustin, M.S., Lindberg, S.E., Weisberg, P.J. 2008 An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. *Applied Geochemistry* 23(3), pp. 482-493.
- Hernández, A.M., 2007. Los mineros del azogue. Ed. Fundación Almadén-Francisco de Villegas. Ciudad Real, 513 pp.
- Hernández, A., Jébrak, M., Higuera, P., Oyarzun, R., Morata, D., Munhá, J. The Almadén mercury mining district, Spain. *Miner Depos* 1999; 34:539–48.
- Hidalgo Fernández-Cano, L., Hidalgo Togores, J. Tratado de viticulture. 4a ed., rev y ampl. Madrid: Mundi-Prensa, 2011. 2v. ISBN 9788484764243.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Oyarzun, Munha, J., Morata, D., (2000) Paleozoic magmatic related hydrothermal activity in the Almadén syncline (Spain): a long-lasting Silurian to Devonian process? *Trans. Inst. Min. Metall. (Sect. B: Appl. Earth Sci.)*. -2000 págs. 109: 199-202.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Biester, H., Lillo, J., Lorenzo, S. (2003) A first insight into mercury distribution and speciation in the Almadén mining district, Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 80: 95-104.
- Higuera, P., Esbrí, J.M., Gray, J., Hines, M., Lillo, J., Lorenzo, S., Molina, J.A., Oyarzun, R., Sánchez, J.A. (2004). Un caso de contaminación milenaria: el Distrito de Almadén. Contribución al VII Congreso Nacional del Medio Ambiente citado en la mineralogía de suelos de la introducción.
- Higuera, P., Molina, J.A., Oyarzun, R., Lillo, J., Esbrí, J.M. Identification of the plant communities and hyperaccumulators in mercury contaminated sectors of the Almadén district Spain. *Mater Geoenviron* 2004; 51(1):103–7.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbrí, J.M., Lorenzo, S. (2006). The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-Contaminated sites. *Science of the Total Environment*, 356, 112-124.
- Higuera, P., Amorós, J. A., Esbrí, J. M., García-Navarro, F. J., Pérez de los Reyes, C., & Moreno, G. (2012). Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 143-151.

Higueras, P., Esbrí, J.M., González, B., López-Berdonces, M.A., García-Noguero, E.M., Martínez, A., Llanos, W., Lorenzo, S. (2012a). Consideraciones ambientales sobre el mercurio en el distrito minero de Almadén. *De Re Metallica*, 19, 2012 pp. 53-65.

Higueras, P., Llanos, W., García, M. E., Millán, R., Serrano, C. (2012b). Mercury vapor emissions from the Ingenios in Potosí (Bolivia). *Journal of Geochemical Exploration*, 116-117, 1-7.

Higueras, P., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez de los Reyes, C., Moreno, G. (2012c). Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 143-151.

Higueras, P., Oyarzun, R., Kotnik, J., Esbrí, J. M., Martínez-Coronado, A., Horvat, M., . . . & Huremović, J. (2014). A compilation of field surveys on gaseous elemental mercury (GEM) from contrasting environmental settings in Europe, south America, south Africa and China: Separating fads from facts. *Environmental Geochemistry and Health*, 36(4), 713-734.

Higueras, P., Fernández-Martínez, R., Esbrí, J.M., Rucandio, I., Loredó, J., Ordóñez, A., Álvarez, R., (2015). Mercury Soil Pollution in Spain: A Review. En *Handbook of Environmental Chemistry*, Volume 32, 2015, Pages 135-158.

Higueras, P. L., Amorós, J. Á., Esbrí, J. M., Pérez-de-los-Reyes, C., López-Berdonces, M. A., & García-Navarro, F. J. (2016a). Mercury transfer from soil to olive trees. A comparison of three different contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6055-6061.

Higueras, P. L., Amorós, J. Á., Pérez de los Reyes, C., García-Navarro, F. J., Esbrí, J. M., Bravo, S., Campos, J.A., Moreno, M. (2016b) Mercury transfer from soils to olive-tree and vines leaves: the case of Almadén (Spain). *European Society for Soil Conservation International Conference. Soil: our common future. Abstracts*. Pp. 3, ISBN 978-973-595-982-1. Cluj-Napoca (Rumanía).

Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., VJereb, Logar, M., Lojen S, et al. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*. 2003; 304:231-56.

IGME (2012) *Atlas Geoquímico de España*. Instituto Geológico y Minero de España, Ed. Juan Locutura Ruperez. Madrid, 592 páginas.

INE (2016) *Estadística del Padrón Continuo a 1 de enero de 2015*. Disponible en <http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t20/e245/p05/a2015/I0/&file=00013006.px>. Ultimo acceso 23 Nov 2016).

ISO/IEC Guide 431, 1997. Proficiency Testing by Inter-laboratory Comparisons Part1: Development and Operation of Laboratory Proficiency Testing [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=27216](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=27216)(accessed 18.03.15).

Kabata-Pendias, A. 2010. Trace elements in soils and plants. Third edition. CRC press LLC. Boca Raton, 548 pp.

Kaiser, G., Tolg, G., 1980. En: *The handbook of Environment Chemistry*, Vol 3. Part A. Hutzinger, O. editor, Springer Verlag, Berlín, Germany, pp. 1-58.

- Kothny, E. L. (1973) The three-phase equilibrium of mercury in nature. In Trace Elements in the Environment; Kothny, E. L., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC; pp 48-80.
- Kowalski, A. & Frankowski, M. 2016. "Seasonal variability of mercury concentrations in soil, buds and leaves of *Tilia platyphyllos* and *Acer platanoides* in central Poland". Environmental Science and Pollution Research, 23, 9614-9624.
- Li, P., Feng, XB., Qiu, GL., Shang, LH., Li, ZG. Review: Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites. Journal of Hazardous Materials. 2009; 168:591-601
- Lindberg, S.E., Jackson, D.R., Huckabee, J.W., Janzen, S.A., Levin, J.J. and Lund, J.R. (1979) Atmospheric emission and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almadén mercury mine. Journal of Environmental Quality 8, 572-578.
- Liu, Z., Wang, L. -, Xu, J., Ding, S., Feng, X., & Xiao, H. 2017. Effects of different concentrations of mercury on accumulation of mercury by five plant species. Ecological Engineering, 106, 273-278.
- Llanos, W., Higuera, P., Oyarzun, R., Esbrí, JM., López-Berdonces, MA., García-Noguero, EM., Martínez-Coronado, A (2010) The MERSADE (European Union) project: Testing procedures and environmental impact for the safe storage of liquid mercury in the Almadén district, Spain. Sci Total Environ 408(20):4901–4905.
- Llanos, W. 2011. Modelización de las emisiones de mercurio gaseoso a la atmósfera en el distrito minero de Almadén (Provincia de Ciudad Real). Tesis Doctoral (Inédito).
- Llanos, W., Kocman, D., Higuera, P., Horvat, M. (2011) Mercury emissions and dispersion models from soils contaminated by cinnabar mining and metallurgy. J Environ Monit 13(12):3460-3468
- López Berdonces, M.A. 2016. Las interacciones aire/suelo/plantas-líquenes/leguminosas-rhizobium del mercurio en áreas contaminadas. Tesis Doctoral (Inédito).
- López Berdonces, M.A.; Higuera, P.L.; Fernández-Pascual, M.; Borreguero, A.M.; Carmona, M. (2017) The role of native lichens in the biomonitoring of gaseous mercury at contaminated sites. Journal of Environmental Management, 186 (Part 2), 207-213.
- López Rodríguez, R.A., Gil, L., Fuentes-Utrilla, P. (2004). «The historical relationship of elms and vines». Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales.
- Lucena, J.J., Hernández, L.E., Carpena-Ruiz, R.O., 1993. Micronutrient content in leguminous plants contaminated with mercury. En: Frago MAC, Van Beusichen ML. Optimization of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 531-537.
- Luo, Y., Duan, L., Driscoll, C. T., Xu, G., Shao, M., Taylor, M., Wang, S., and Hao, J. (2016) Foliage/atmosphere exchange of mercury in a subtropical coniferous forest in south China, J. Geophys. Res.-Biogeo., 121, 2006–2016,



Malikova, I., 1999. Distribution of mercury in the soil-plant system of the territory of Altay Region. En: International Symposium of Geochemical Barriers in the Hypergenic Zone, Moscow.

MAPAMA, 2018. Datos del Sistema de Información de Mercados del Sector Vitivinícola, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en [https://www.mapa.gob.es/es/prensa/180122datosproduccionprovisionalvinoymosto\\_tcm30-438450.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/prensa/180122datosproduccionprovisionalvinoymosto_tcm30-438450.pdf). Último acceso 08 abril 2019.

Marschner, P., 2012. Nutrition of higher plants. 3<sup>rd</sup> edition. Elsevier.

Martínez-Coronado, A., Oyarzun, R., Esbrí, JM., Llanos W., Higuera, P. (2011) Sampling high to extremely high Hg concentrations at the Cerco de Almadenejos, Almadén mining district (Spain): The old metallurgical precinct (1794 to 1861 AD) and surrounding areas. *J Geochem Explor* 109(1–3):70–77.

Martínez-Coronado, A. 2012. Tesis Doctoral. Mercurio atmosférico en el distrito minero de Almadén. Comparación con otras áreas. Departamento de explotación y prospección de minas. Universidad de Oviedo. Disponible en <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/15135>

Martínez-Coronado, A., Esbrí, J. M., & Higuera, P. (2016). Time variations of gaseous and reactive mercury in the industrial area of Puertollano (South-Central Spain). temporal cycles with marked variations. *Atmospheric Environment*, 134, 198-207.

Maruyama, S. 1996. Responses to Minamata Disease. En: Mitchell, J.K. (Ed) *The Long Road to Recovery. Community Responses to Industrial Disaster*. United Nations University Press, <http://archive.unu.edu/unupress/unupbooks/uu21le/uu21le05.htm>.

Maurice-Bourgoin L., Aalto R., Fraizy P., Barnaud V. and Guyot J.L., 2001. Modulation of Mercury Transport through Fluvial Systems by Channel-Flood plain Interaction: A Case Study for the Beni River, Bolivian Amazonia. In: 6th Int. Conference on Mercury as a global pollutant, Minamata, Japan.

Mendelssohn, I.A.; K.L. McKee y T. Kong. 2001. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. *Environ. Exp. Bot.* 46, 263-275.

Millán, R., Gamarra, R., Vera, R., Schmid, T. Mercury uptake for plant species from an Almadén test plot. In: Gobran GR, Lepp L, editors. *Proceedings of the 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, vol. 4. 15–19 June. Uppsala (Sweden): SLU; 2003. p. 30–1.

Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Vera, R., Sierra, MJ., Quejido, AJ., et al. Mercury content in natural vegetation of three plots in the mining area of Almadén (Spain). *Mater Geoenviron* 2004;51(1):155–8.

Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Quejido, A., Sánchez, D.M., Cardona, A.I., Fernández, M., Vera, R., 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of the Total Environment* 368, 79-87.

Millán, R., Carpena, R.O., Schmid, T., Sierra, M.J., Moreno, E., Peñalosa, J., Gamarra, R., Esteban, E., 2007. Rehabilitación de suelos contaminados con mercurio: estrategias aplicables en el área de Almadén. *Ecosistemas*, 16 (2).

Millán, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Carrasco-Gil, S., Villadóniga, M., Rico, C., Ledesma, D.M.S., Puente, F.J.D. (2011) Spatial variation of biological and pedological properties in an area affected by a metallurgical mercury plant: Almadenejos (Spain). *Appl Geochem* 26 (2):174–181.

Millhollen, A., Gustin, M., Obrist, D. Foliar Mercury Accumulation and Exchange for Three Tree Species. *Environ Sci Technol*. 2006; 40:6001-6.

Millhollen, A.G., Obrist, D., Gustin, M.S. Mercury accumulation in grass and forb species as a function of atmospheric carbon dioxide concentrations and mercury exposures in air and soil. *Chemosphere*. 2006; 65:889-97.

Miteva, I.; Higuera, P.; Esbrí, J.M.; Nikolova, N. Mercury determination with mosses in the mining district of Almadén, Spain. 2018.

Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P. (2006) Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: One of the most contaminated sites on earth. *Environmental Geochemistry and Health*, 28(5), 487-498.

Naharro, R., Esbrí, J.M., Amorós, J.A., García-Navarro, F.J., Higuera, P. (2018) Assessment of mercury uptake routes at the soil-plant-atmosphere interface. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*. DOI: 10.1144/geochem2018-019.

Navarro A, Biester H, Mendoza JL, Cardellach E (2006) Mercury speciation and mobilization in contaminated soils of the Valle del Azogue Hg mine (SE, Spain). *Environ Geol* 49(8):1089– 1101 (B).

Navarro, A. (2008) Review of characteristics of mercury speciation and mobility from areas of mercury mining in semi-arid environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7:287–306.

Navarro, A., Cardellach, E., Corbella, M. (2009) Mercury mobility in mine waste from Hg-mining areas in Almería, Andalusia (Se Spain). *J Geochem Explor* 101(3):236–246 (A).

Ordóñez, A., Álvarez, R., Loreda, J. (2013) Asturian mercury mining district (Spain) and the environment: A review. *Environ Sci Pollut Res* 20(11):7490–7508.

Oyarzun, R., Higuera, P., Esbrí, J.M., Pizarro, J. (2007) Mercury in air and plant specimens in herbaria: A pilot study at the MAF herbarium in Madrid (Spain). *Science of the Total Environment*, 387 (1-3), 346-352.

Patra, M. and Sharma, A., 2000. Mercury Toxicity in Plants. *The Botanical Review* 66 (3), 379-422.

Pavel, E. W.; Fereres, E. (1998): Low soil temperatures induce water deficits in olive (*Olea europaea*) trees. *Physiol. Plant*. 104, 525-532.

- Puche, O. (1989). Mecanismos estructurales de los volcanismos paleozoicos en la región Alcudiense. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Qiu, Q., Feng, X., Wang, S., Shang, L. Mercury and methylmercury in riparian soil, sediments, mine-waste calcine, and moss from abandoned Hg mines in east Guizhou province, southwestern China. *Appl Geochem*. 2005; 20:627-38.
- Qiu, G., Feng, X., Wang, S., Xiao, T. Mercury contaminations from historic mining to water, soil and vegetation in Lanmuchang, Guizhou, southwestern China. *Sci Total Environ*. 2006; 368:56-68.
- Rao, M. V. & Dubey S. P. 1992. Occurrence of heavy metals in air and their accumulation by tropical plants growing around an industrial area. *Science of the Total Environment*, 126, 1-16.
- Rivera, S., Esbrí, J.M., Naharro, R., Higuera, P. (2017) Incorporación de mercurio al suelo de un sistema experimental de captación de mercurio por plantas. Contribución al I Simposio Nacional de Mercurio. Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén, UCLM.
- Rodríguez-Martín, JA., López Arias, M., Grau Corbí, JM. (2006) Heavy metals contents in agricultural topsoils in the Ebro basin: application of the multivariate geostatistical methods to study spatial variations. *Environ Pollut* 144:1001-1012.
- Rojas, S., Barquero, J.I., García-Noguero, E.M., Esbrí, J.M, Higuera, P. (2016). Mercury contents in pine leaves from Almadén (Spain) in relation with contents in soils and atmosphere. *Proceedings of the Energy and Environment Knowledge Week Congress (E2KW2016)*. Edited by: Sáez-Martínez, J.J., Jiménez, E., Lefebvre, G., Beekmann, M. Pp. 118-120. ISBN: 978-84-608-8219-0. París (Francia).
- Rothenberg, SE., Du, X., Zhu, Y-G., Jay, A. The impact of sewage irrigation on the uptake of mercury in corn plants (*Zea mays*) from suburban Beijing. *Environmental Pollution*. 149; 2007:246-51.
- Rutter, A. P., Schauer, J. J., Shafer, M. M., Creswell, J. E., Olson, M. R., Robinson, M., Collins, R.M., Parman, A.M., Katzman, T.L. Mallek, J. L. (2011). Dry deposition of gaseous elemental mercury to plants and soils using mercury stable isotopes in a controlled environment. *Atmospheric Environment*, 45(4), 848-855.
- Saupé, F., 1990. The geology of the Almadén mercury deposit. *Economic Geology*, 85: 482-510
- Sánchez -Martín, G., 1924. Estudio médico del hidrargirismo en las Minas de Almadén. *Revista Minera*, Madrid 89 p.
- Skerfving, B., Copplestone, J.F. (1976). Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. *World Health Organ*. 54, 101-112.
- Shaw, B.P.; S.K. Sahu y R.K. Mishra. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad, M. (ed.). *Heavy metal stress in plants from biomolecules to ecosystems*, second edition. Springer-Verlag, New York, NY.

Sholupov, S., Pogarev, S., Ryzhov, V., Mashyanov, N. & Stroganov, A. 2004. Zeeman Atomic Absorption Spectrometer RA-915+ for Direct Determination of Mercury in Air and Complex Matrix Samples. *Fuel Process Technology*, 85, 473-485.

Si, L., Ariya, P. A. 2018. Recent advances in atmospheric chemistry of mercury. *Atmosphere*, 9(2). doi:10.3390/atmos9020076.

Sierra, M.J (2008). Alternativas de uso agrícola para suelos con altos contenidos de mercurio: aplicación a la comarca minera de Almadén. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid-Centro de Investigaciones Energéticas, Mediambientales y Tecnológicas, España.

Soil Survey Staff, 1999. *Soil Taxonomy. A basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*. Second edition, United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, Agricultural Handbook Number 436, 871 pp.

Stamenkovic, J., Gustin, M.S (2009) Non stomatal versus stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environmental Science and Technology*, 43(5), 1367-1372.

Tekran, 2012. Tekran 2537 CVAFS Automated Ambient Air Analyzer. Tekran Products-Ambient Air, <http://www.tekran.com/products/ambient-air/tekran-model-2537-cvafs-automated-mercury-analyzer/>

Tejero-Manzanares, J., Higuera, P., Garrido, I., Esbrí, J.M., Oyarzun, R., Español, S. (2015). An estimation of mercury concentrations in the local atmosphere of Almadén (Ciudad Real province, South Central Spain) during the twentieth century. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), pp. 4833-4841.

UE, 2018. Reglamento (UE) 2018/73 de la Comisión, de 16 de enero de 2018, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites máximos de residuos de compuestos de mercurio en determinados productos. Disponible en [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2018.013.01.0008.01.SPA](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2018.013.01.0008.01.SPA). Último acceso 08 abril 2019.

Urbina Vallejo, V. (2015). El medio ecológico en plantaciones frutales. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de Lleida.

Viladevall, M., Font, X., Navarro, A. (1999) Geochemical mercury survey in the Azogue Valley (Betic area, SE Spain). *J Geochem Explor* 66(1–2):27–35.

Wang, S., Jia, Y., Wang, S., Wang, X., Wang H., Zhao Z., et al. Total mercury and monomethylmercury in water, sediments, and hydrophytes from the rivers, estuary, and bay along the Bohai Sea coast, Northeastern China. *Applied Geochemistry*. 2009; 24:1702-11.

Weigelt, A., Ebinghaus, R., Pirrone, N., Bieser, J., Bödewadt, J., Esposito, G., . . . & Ziereis, H. 2016. Tropospheric mercury vertical profiles between 500 and 10 000 m in Central Europe. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(6), 4135-4146.

WHO. Environmental health criteria 86: Mercury – environmental aspects. Geneva: World Health Organization;1989

Yu Q, Luo Y, Wang S, Wang Z, Hao J, Duan L. (2018) Gaseous elemental mercury (GEM) fluxes over canopy of two typical subtropical forests in south China. *Atmos. Chem. Phys.*, 18, 495–509.

Zhang, W. H.; Tyerman, S. D. (1999) Inhibition of water channels by  $\text{HgCl}_2$  in intact wheat root cells. *Plant Physiology*, 120 (3), 849–857.

Zhang, Z.Q.; W.S. Shu; C.Y. Lan y M.H. Wong. 2001. Uptake and translocation of heavy metals in dominant plants of soil seed banks introduced to a lead/zinc mine tailings pond. *Acta Phytoecol. Sinica* 25, 306- 311.

Zheng N, Wang Z, Zheng D, Mercury contamination and health risk to crops around the zinc smelting plant in Huludao DCity, Northeastern China. *Environ Geochem Health*. 2007;29: 385-93.

Zheng, S. -, Wu, Z., Chen, C., Liang, J., Huang, H., & Zheng, X. 2017. Evaluation of leafy vegetables as bioindicators of gaseous mercury pollution in sewage-irrigated areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), pp. 413-421.

## **Anexo A.**

**Naharro, R.**, Esbrí, J.M., Amorós, J.A., García-Navarro, F.J., Higuera, P. (2019) Assessment of mercury uptake routes at the soil-plant-atmosphere interface. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 19(2):146.



# Assessment of mercury uptake routes at the soil-plant-atmosphere interface

Rocío Naharro<sup>1</sup>, José María Esbrí<sup>1</sup>, José Ángel Amorós<sup>2</sup>, Francisco J. García-Navarro<sup>2</sup> & Pablo Higuera<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Geología Aplicada, IGeA, Universidad de Castilla-La Mancha, Plaza de Manuel Meca, 1, 13400, Almadén, Ciudad Real, Spain

<sup>2</sup> Escuela de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Ronda de Calatrava, 7, 13071, Ciudad Real, Spain

J.Á.A., 0000-0002-7507-9724; F.J.G., 0000-0003-3162-3182; P.H., 0000-0002-3662-7302

\* Correspondence: [pablo.higuera@uclm.es](mailto:pablo.higuera@uclm.es)

**Abstract:** Mercury is easily transformed from the elemental state or numerous other mercury compounds to its gaseous form. The gaseous mercury species remain in the atmosphere for sufficient time to be carried long distances. In many cases, some of these differences produce a bias in experimental research, especially for the understanding of the soil-plant-atmosphere system in polluted sites. The main controversy concerns the preferential uptake route in plants and whether the process is reversible or not. The aims of the work described here were to acquire a better knowledge of the transfer routes in the soil-plant-atmosphere system and to ascertain whether plant mercury uptake is reversible. Factors such as the presence of mercury in the atmosphere and irrigation water were evaluated using two common species in Castilla-La Mancha: vines (*Vitis vinifera*, L.) and olive trees (*Olea europea*, L.). The results provide evidence of three important aspects: plant mercury uptake via roots does occur but it seems minor; plant mercury uptake from the atmosphere involves a continuous exchange at the leaf-atmosphere interface; and plant mercury bioaccumulation seems to be a reversible process. These findings have implications for the use of plants as biomonitors by restricting the exposure times, and in phytoremediation, particularly for polluted soils.

**Keywords:** Plant mercury uptake; olive; vine; TGM

**Received** 5 March 2018; **revised** 4 June 2018; **accepted** 13 June 2018

Mercury is a unique metal in many ways. In fact, it is the only element that is a liquid at room temperature and the only one with a vapor pressure that is high enough to reach high concentrations in the atmosphere. The biogeochemistry of Hg is also peculiar in that some of its species, particularly the organic species such as methylmercury ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ ), are extremely toxic (Clarkson & Magos 2006; Mergler *et al.* 2007; Castro-González & Méndez-Armenta 2008). Furthermore, these most toxic species are quite common and are present at sufficiently high concentrations in food that they eventually produce toxicity in humans. However, the real agents that carries MeHg into the human food chain are fish and rice (Gong *et al.* 2018); these organisms take up low concentrations of Hg from water and fish have the ability to reach extremely high concentrations of MeHg through bioaccumulation and biomagnification (Harada 1995; Morel *et al.* 1998; Harris *et al.* 2003; Driscoll *et al.* 2013; Beckers & Rinklebe 2017).

However, cases related to the toxification of the human population by Hg present in edible plants have been only occasionally described: Bose-O'Reilly *et al.* (2016) show cases of poisoning in Indonesia due to Hg exposure through air, fish and specially rice. Göthberg & Greger (2006) and Greger & Dabrowska (2010) also mention this possibility based on the presence of MeHg in water spinach (*Ipomoea aquatica*), an aquatic macrophyte that is a popular vegetable in tropical regions. On the other hand, relatively high total Hg concentrations are found in plants grown in Hg-polluted areas (Lindberg *et al.* 1979; Gnamuš *et al.* 2000; Millán *et al.* 2006; Overesch *et al.* 2007; Zheng *et al.* 2007; Antoniadis *et al.* 2017). At present, most research supports the idea that Hg accumulated in such plants and areas has a foliar uptake, while radicular uptake from the soil (or

possibly translocation from the root to aerial parts) is weak (Erickson *et al.* 2003; Stamenkovic & Gustin 2009; Higuera *et al.* 2012, 2016; Assad *et al.* 2016; Kowalski & Frankowski 2016; Barquero *et al.* 2017).

Almadén (Ciudad Real province, South Central Spain) is the center of the most important Hg mining district in the world (Hernández *et al.* 1999). Mercury has been present in the atmosphere at extremely high concentrations during industrial times, but nowadays, after the closure of the mine and the cessation of metallurgical ore processing, concentrations have decreased to levels that do not cause concern (Tejero *et al.* 2015), although huge amounts of Hg remain in soils and sediments (Molina *et al.* 2006; García-Ordiales *et al.* 2017, respectively). Almadenejos is a small village (456 inhabitants, INE 2015) situated some 11 km to the ESE of Almadén and it is part of the Almadén mercury mining district: three mercury mines of some importance have been exploited in its surroundings in the last five centuries (until the closure of the El Entredicho open pit in 1997), and a metallurgical precinct is located immediately to the north of the urban area (Martínez-Coronado *et al.* 2011; Millán *et al.* 2011). In this area of Almadenejos, due to the presence of the unreclaimed metallurgical precinct and other minor sources, the presence of atmospheric Hg is markedly higher than in Almadén (Martínez-Coronado *et al.* 2011).

We present here the results of experimental work aimed at confirming the exchange of Hg by plants, based on the presence of the element in the atmosphere or irrigation water and using leaves of vines and olive trees as the main indicator. The aim of this study was to obtain a better view of transfer routes in the soil-plant-atmosphere system and to ascertain whether plant Hg uptake is reversible, and also to evaluate the importance of this route.

## Materials and methods

### Site selection and monitoring

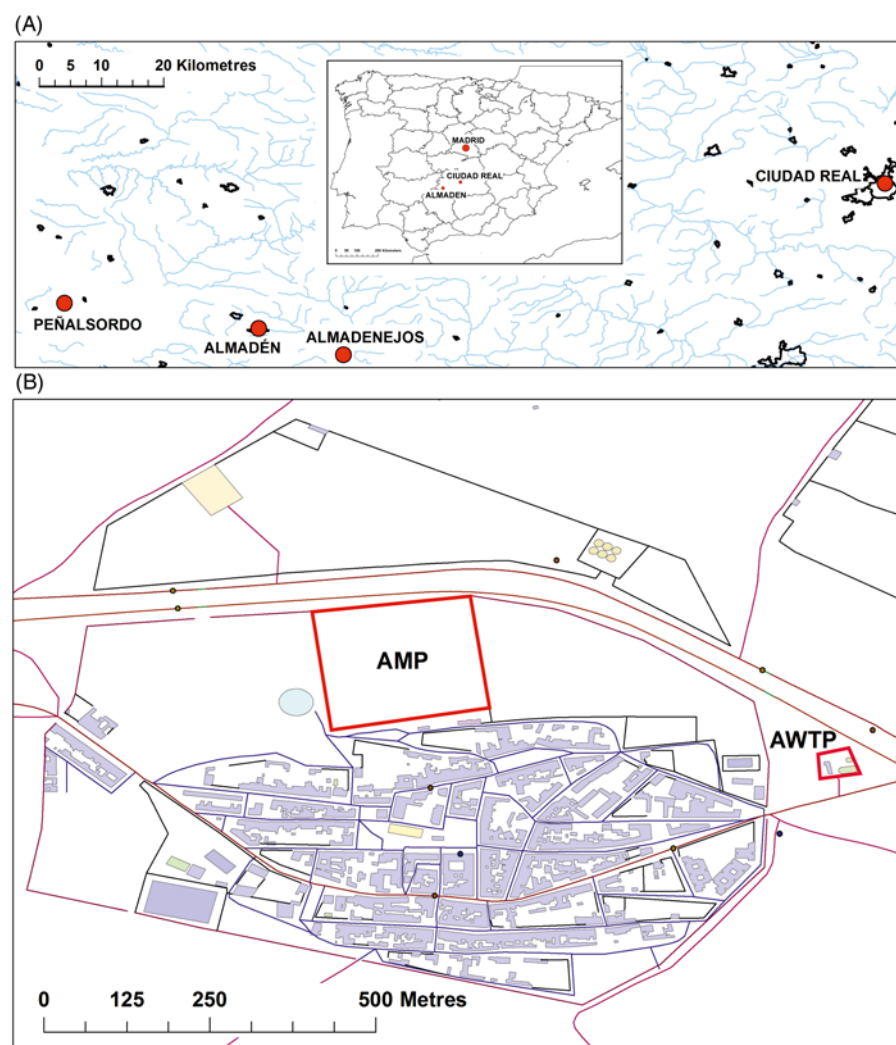
The sites selected for the experimental works (Fig. 1) were chosen due to their different contents of atmospheric Hg, i.e. extremely high at the Almadenejos wastewater treatment plant (AWTP) and low in Ciudad Real and Peñalsordo (Badajoz province).

The Almadenejos site was selected due to the highly anomalous presence of total gaseous mercury (TGM) in order to evaluate the Hg uptake by vine and olive leaves through respiration processes. This site (ETRS89 UTM 30S, 351706E – 4289243N) was characterized by huge emissions coming from the nearby Almadenejos metallurgical precinct (AMP). The AWTP consists of a small enclosed plant located some 100 m to the east of the urban area, and 430 m to the east of the AMP, which is an important source of atmospheric Hg. The experimental setup in the AWTP was designed to study plant Hg uptake from the soil and atmosphere. Plants (*Vitis vinifera*, L. and *Olea europea*, L.) were put in place from 8/07/2015 to 23/06/2016 close to a wall and oriented to the east to avoid the sun affecting the plants in the afternoon, which would put them under excessive water stress. In the experiment, a total of 12 plant specimens of vines were used and these were separated into four groups of three individuals with differences in Hg concentration in the irrigation water: 0, 5, 50 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . At this site, atmospheric Hg dispersion patterns in time and space were monitored for a whole year by the research team (data unpublished). TGM data were collected simultaneously in plant experiments using a TEKRAN 2537B analytical device combined with a Lumex

RA-915M device. Micrometeorological parameters were measured simultaneously on a Davis Vantage-pro fully automatic station, with a sensor tower located in a clear area of AWTP and a console unit located inside the facility for data acquirement (15 min of data interval). The main parameters directly measured were ambient temperature, relative humidity, solar radiation, wind speed, wind direction, UV radiation and atmospheric pressure, while other parameters like dew point or evapotranspiration were calculated from these parameters.

The second site (Ciudad Real, some 80 km to the NE of Almadenejos) was considered as a background location in terms of atmospheric Hg and this was an appropriate location to study the radicular uptake from the soils in the absence of atmospheric Hg. Plants were placed from March 2016 to June 2016 in the School of Agronomics of Ciudad Real (UCLM) (ETRS89 UTM 30S, 420341E, 4315716N). Plants were irrigated once per week with mineral water that was free from Hg and with mineral water spiked with 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  of mercury nitrate. TGM measurements were carried out with the aid of a Lumex RA-915+ system on a daily cycle to check background conditions.

The third site (Peñalsordo, some 40 km to the West of Almadenejos) was selected due to its low presence of TGM to evaluate the possibility of Hg desorption from olive leaves through respiration processes. Plants previously exposed to atmospheric Hg in the AWTP were put in place from June–September 2016 on a terrace of a building in the center of Peñalsordo (ETRS89 UTM 30S, 316300E–4298963N), a small agricultural town (1008 inhabitants; INE, 2015) located 21 km to the west of Almadén



**Fig. 1.** Location of Almadenejos relative to (A) Peñalsordo and (B) the AWTP relative to AMP.



## Mercury uptake

city. Mercury sources have never been described at this location and it was therefore expected that the atmospheric Hg concentrations would be typical background values. TGM measurements were carried out with the aid of a Lumex RA-915 M device in continuous mode. During the process, both in Almadenejos and Peñalsordo, the plants were watered with mineral water that was free from appreciable Hg content.

The quality of the TGM measurements was ensured with the Tekran device by carrying out frequent calibrations (one every three days) with an internal permeation source. The Lumex device was checked before each period of measurements to ensure that calibration was within the acceptable range (Sholupov *et al.* 2004).

### Leaf sampling, preparation and analysis

At the AWTP, leaf samples were taken every 15 days, using nitrile gloves and tweezers, and stored in 50-ml. polypropylene flasks. Each sample consisted of a mixture of five leaves from different parts of the plant, with a total sum of 66 samples for the whole sampling period. In Ciudad Real, leaf samples were taken by following the same procedure at the same time as the AWTP samples in order to homogenize micrometeorological conditions. At the end of the experiment, the total sum of samples was 24, six for each sampling period distributed in three replicates for each Hg concentration in irrigation water (0 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). In Peñalsordo, composite samples ( $n=4$ ) were taken periodically following the same procedure during 45 days of exposure.

Leaf samples were freeze-dried in a Telstar Cryodos system. The working conditions were  $-53.7^{\circ}\text{C}$  and a vacuum of 0.175 mBar. The next procedure involved crushing the leaves using a small mill in order to obtain a homogeneous sample prior to analysis.

Total mercury (THg) determinations were made by atomic absorption spectrometry using a Lumex RA-915+ device with a PYRO-915+ pyrolysis attachment (Sholupov *et al.* 2004). QA/QC was checked by the analysis of duplicate samples and a certified reference material (NIST 2710a for soils and BCR62 for the plants matrix). Percentage recovery of Hg in the CRMs were 86–109% for NIST 2710a and 89–120% for BCR62, while precision of measurement, estimated as relative standard deviation, were 4% for the soil matrix and 7% for the plant matrix.

### Statistical data treatment

Data treatment for all parameters considered consisted of a basic Pearson correlation study, followed by a cluster analysis using normalized data, with similarity as the distance between groups and using Ward's linkage. Minitab 15 statistical software was used.

## Results

### Soil absorption experiment

The aim of this experiment was to assess plant Hg uptake by roots or shoots in a real environment. Two sites were selected for this purpose: one with high levels of atmospheric Hg (AWTP) and the other with background levels of atmospheric Hg (Ciudad Real). Analysis of total Hg shows an average of 145  $\text{ng g}^{-1}$  in Almadenejos, the standard deviation being remarkably high (68  $\text{ng g}^{-1}$ ). Seasonally, a higher average in AWTP was reached in the winter period (175  $\text{ng g}^{-1}$ ) while a lower average was obtained in autumn (135  $\text{ng g}^{-1}$ ), the averages for summer and spring being very close to 150  $\text{ng g}^{-1}$ . Differences between maximum and minimum Hg concentrations were 294  $\text{ng g}^{-1}$  in spring, but only 194  $\text{ng g}^{-1}$  in summer. All these data suggest an absence of a relationship between the season considered and Hg concentration in the plant leaves. The results indicated that the application of water with increasing amounts of Hg led to an

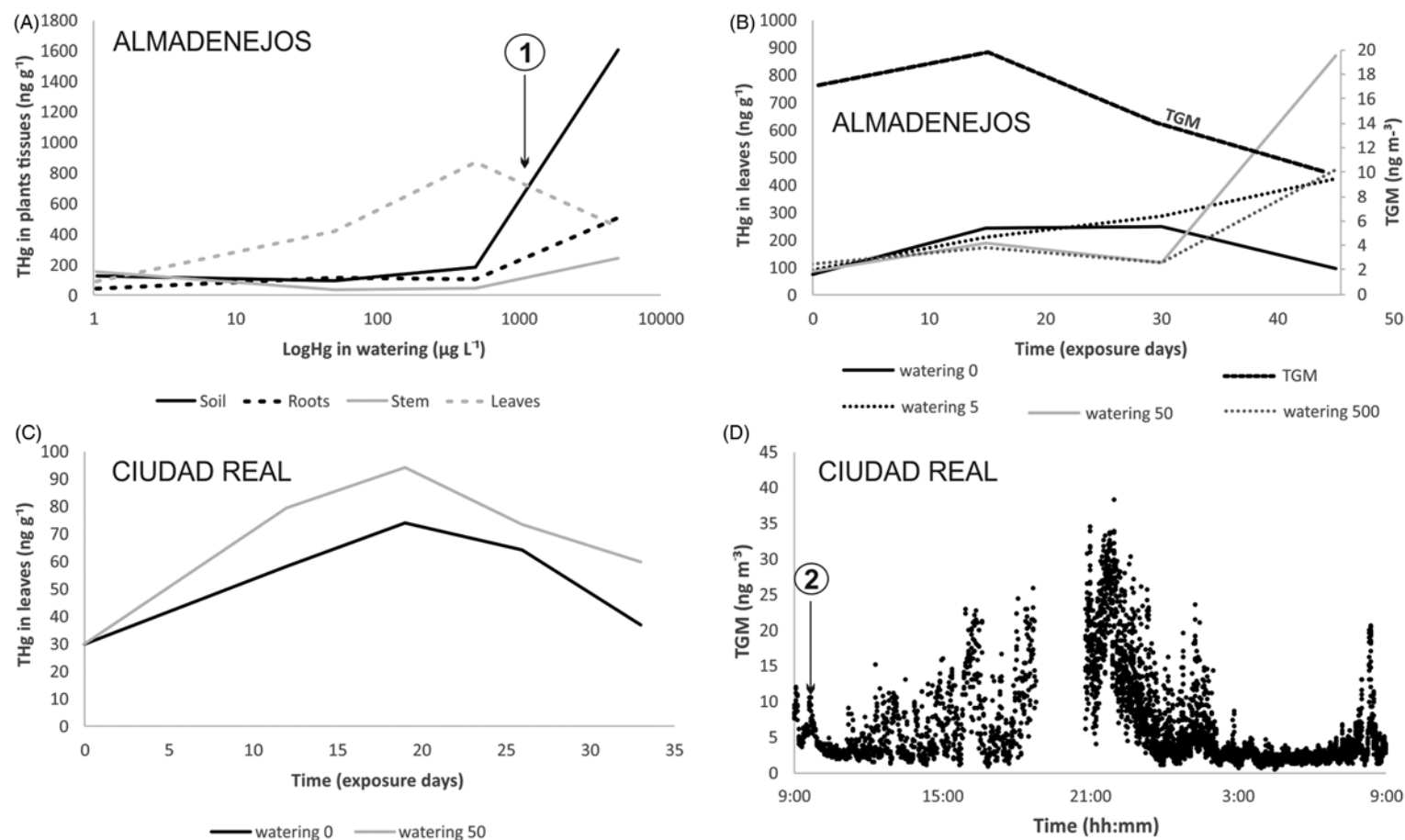
increase in Hg concentration in soils, roots, stems and leaves (Fig. 2A), showing statistically significant differences. The order of Hg bioaccumulation below 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  in water was leaves > soil > roots > stems whereas if the irrigation water had 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Hg the order was soil > roots > leaves > stems. If one assumes that Hg is entering the soils, roots and stems by watering, while in leaves it enters from the atmosphere, it can be concluded that below certain concentrations (Point 1 in Fig. 2A) the bioaccumulation capacity is greater from the atmosphere than from soil watering and vice versa: above this concentration the preferential route is atmospheric. Furthermore, increases in the amounts of Hg in the irrigation water did not lead to increasing amounts of Hg in leaf tissues in the absence of Hg in the atmosphere (Fig. 2B). Vine leaves showed virtually constant increases in Hg up to 30 days of exposure, with a rapid increase thereafter, especially for plants watered with 50  $\mu\text{g Hg L}^{-1}$ . It is important to note that the order of leaf samples in terms of Hg contents was water 5 > water 0 > water 50 = water 500 after 30 days of exposure, which changed to water 50 > water 500 > water 5 > water 0 after 45 days of exposure. The Hg contents in vine leaves grown in an atmosphere with background levels of atmospheric Hg (Ciudad Real) are shown in Figure 2C. Plants irrigated with Hg-containing water showed higher Hg contents in leaves than those irrigated with mineral water. The increase was evident during the first 20 days of exposure, but a decrease was observed thereafter both in plants irrigated with or without Hg, showing statistically significant differences. The daily cycle of atmospheric Hg (Fig. 2D) showed a slight increase in TGM levels after irrigation (Point 2 in Fig. 2D) and higher contents in the late afternoon. It is important to note that increases in TGM were measured only on watering days. If Figure 2D is considered in detail, a clear decrease in TGM levels can be observed during night hours with respect to background TGM levels. This was the most frequently observed behaviour during the experiment and it was interrupted only by high TGM conditions during watering days.

The results discussed above confirm those reported by Assad *et al.* (2016) on *Populus sp.* in pots, with no correlation found between Hg content in soil and leaves ( $p > 0.02$ ); in a second experiment, performed far from the contaminated site, the Hg contents in the substrate did not correlate with the concentration in the leaf ( $p > 0.02$ ). These two experiments reinforce the interpretation that the atmospheric route can act as the preferred one in leaf contamination by Hg.

### Atmospheric absorption experiment

In this stage of the experiment, olive trees were placed in the atmospheric absorption experiment in AWTP, very close to a huge atmospheric Hg source (Llanos *et al.* 2011; Martínez-Coronado *et al.* 2011). Concentrations of Hg in leaves were on average 145  $\text{ng g}^{-1}$  in Almadenejos, but only 23  $\text{ng g}^{-1}$  in Peñalsordo (Table 1). Higuera *et al.* (2016) described higher Hg values in olive-tree leaves from mining and industrial sites, for instance: 1213  $\text{ng g}^{-1}$  in Almadén mining district, 481  $\text{ng g}^{-1}$  in Flix (a currently operative chloralkali industry) and 161  $\text{ng g}^{-1}$  in Jódar (a decommissioned chloralkali facility). All these figures are higher than the average Hg contents in Almadenejos, but if we compare maximum levels, it can be seen that in this work olive leaves reach 333  $\text{ng g}^{-1}$ , i.e. lower than the values from locations close to industrial facilities (453  $\text{ng g}^{-1}$  Jódar, 1270  $\text{ng g}^{-1}$  Flix) and well below those measured in a mercury mining district like Almadén (2742  $\text{ng g}^{-1}$ ). Background areas showed lower Hg contents, with an average value of 110  $\text{ng g}^{-1}$  in Calabria (Bargagli 1995).

Time variations (Fig. 3A) showed a continuous Hg exchange between tree leaves and the local atmosphere during 351 days of exposure. Mercury concentrations in leaves ranged from an initial 40–50  $\text{ng g}^{-1}$  to very variable concentrations as in an emission/



**Fig. 2.** Plots of (A) Hg in vine tissues v. Hg in irrigation water, (B) Hg in vine leaves and TGM v. exposure days, (C) Hg in vine leaves v. exposure days and (D) TGM v. time during a watering day. Almadenejos represents a site with Hg present in watering and atmosphere, while Ciudad Real represents a site with Hg present only in the watering.

## Mercury uptake

**Table 1.** Statistical summary of THg concentrations in  $\text{ng g}^{-1}$  in olive leaves in the AWTP and Peñalsordo

	AWTP Olive 1	AWTP Olive 2	AWTP Olive 3	AWTP On average	Peñalsordo Olive 2
Maximum	333	320	195	333	29
Minimum	46	26	55	26	15
Average	155	168	110	145	23
SD	65	80	42	68	6

deposition cycle, with values up to  $330 \text{ ng g}^{-1}$  reached during the exposure period in Almadenejos. Maximum THg contents (Table 1) were reached during winter for Olive 1, spring for Olive 2 and summer for Olive 3. The behaviour of each plant, considered in terms of Hg uptake, showed minor differences, despite the fact that the plants were placed next to each other and that differences in TGM values were not expected for a distance between plants smaller than 10 cm.

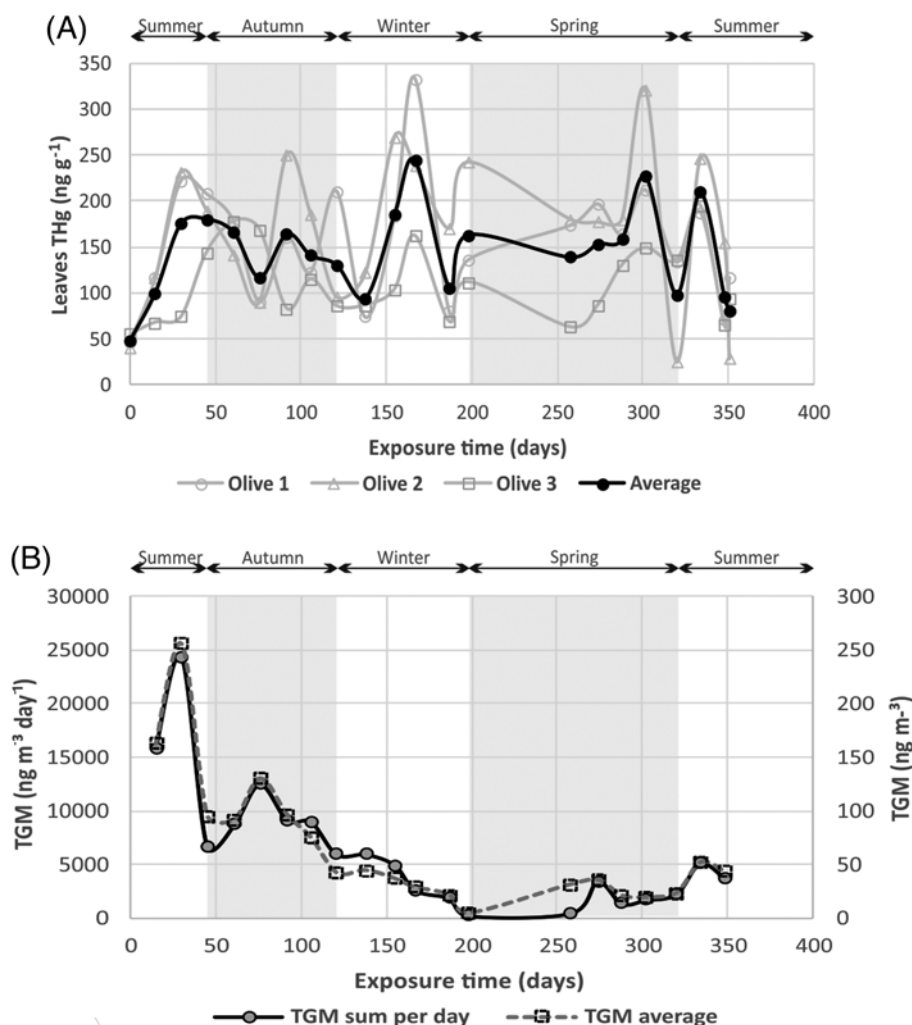
Measured levels of TGM at this site during the experiment showed a different evolution pattern (Fig. 3B) to that described above, with higher average levels ( $250 \text{ ng m}^{-3}$ ) during the first summer period and a slow decrease during autumn and winter, until average levels of  $4 \text{ ng m}^{-3}$  were reached at the end of winter period. After that, a clear and slow increase was observed from 22nd of January 2016 through spring and summer periods, until levels of  $51 \text{ ng m}^{-3}$  were reached. An attempt has been made to clarify if the daily variations could make the daily average unrepresentative, included in Figure 3B the daily sum of the concentrations that shows the same trends.

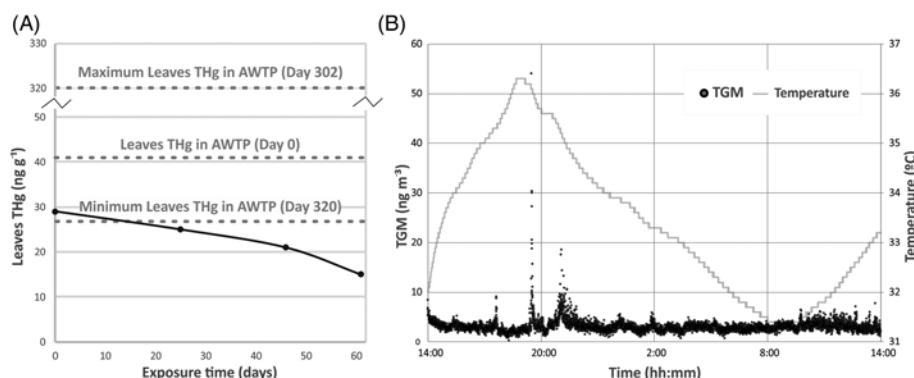
A mass balance for Olive 2 was calculated using the initial and final wet weights of all parts of the olive plant (soil, roots, stems and

leaves) and the mercury concentrations in dry weights. A conversion factor between wet and dry weights was obtained to carry out the calculations. The data show that the olive tree initially has a total Hg amount of 1416 ng, with a maximum Hg content of 11 056 ng reached in May 2016 and 1002 ng at the end of the absorption experiment. If we restrict the mass balance to the period between the beginning and the day with the maximum total Hg absorbed, the net increase was 680% of the initial Hg amount, which demonstrates the high bioaccumulation capacity of leaves when Hg is available in high concentrations in the atmosphere. The net balance from the beginning to the end of the experiment was a loss of 414 ng during a complete annual cycle. This net Hg loss is in good agreement with the decrease in TGM in the AWTP atmosphere from July 2015 to June 2016 (Fig. 3B).

#### Atmospheric desorption experiment (Peñalsordo, Badajoz province)

The statistical summary of Hg concentrations in olive-tree leaves in Peñalsordo (Table 1) shows maximum and average figures that are

**Fig. 3.** Evolution of (A) THg contents in olive leaves in the AWTP and (B) under high TGM conditions.



**Fig. 4.** (A) Mercury desorption profile for olive leaves in Peñalsordo and (B) daily cycle of TGM measured during 25–26 of August 2016 near olives plants.

much lower even than the background values described by Bargagli (1995). This decrease was continuous over time (Fig. 4A), from some 30 ng g<sup>-1</sup> at the beginning of the experiment to 15 ng g<sup>-1</sup> at the end in mid-August. These values are far lower than the maximum concentration reached in the AWTP on exposure day 302, and lower than at the beginning of the experiment.

The presence of atmospheric Hg in the atmosphere at Peñalsordo was checked by measurements of daily cycles during August. One of these cycles is represented in Figure 4B, with 99.8% of the values below 10 ng m<sup>-3</sup> and 96.9% below 5 ng m<sup>-3</sup>. These TGM levels mean that Peñalsordo can be considered to be a background site in terms of TGM present in the atmosphere, especially in comparison with other data like those reported for pristine areas by Higuera *et al.* (2014), with values of 0.3–10 ng m<sup>-3</sup> in South Africa or 4–6 ng m<sup>-3</sup> in some Brazilian cities, or those described by Weigelt *et al.* (2016) in Central Europe, which were in the range 1.4–1.6 ng m<sup>-3</sup>. It can also be seen in Figure 4B that some anomalous TGM values were measured in the late afternoon, when temperatures rise to their maximum levels (only 16 TGM measurements reach figures up to 10 ng m<sup>-3</sup>). This is a similar effect to that described by Esbri *et al.* (2016) for the Almadén area, where the decrease in wind speed produces a rapid increase in TGM levels in the late afternoon. It should be noted that diffuse Hg emissions in Almadén city are expected to be of greater importance than in Peñalsordo village, but olive-tree leaves and its mulch on the pot surface have a net Hg quantity acquired in the AWTP and this is available to be emitted when micrometeorological conditions are favourable.

A mass balance was performed on Olive 2, following the same procedure as in the AWTP. The results of this mass balance, corresponding to the exposure to Hg-free air from early June to late August of 2016, showed that olive-tree leaves had desorbed a total amount of 380 ng, i.e. from 1002 ng at the beginning of the experiment to 621 ng at the end in August. In relative terms, olive-tree leaves had lost 37% of their Hg over 60 days at an almost constant rate of 8.8 ng day<sup>-1</sup>.

### Relationship between Hg concentrations in leaves, TGM and meteorological parameters

A single Pearson correlation study did not provide significant clues about the influence of TGM and meteorological factors on Hg uptake by olive leaves (Table 2). However, a cluster analysis provided more information about the existence or absence of multiple relationships between the studied parameters. As shown in Figure 5, the Hg contents in olives leaves (Olive 1–3) showed a less clear relationship than one would expect in plants of the same species, age and located next to each other. These three specimens of olive tree seem to have only a weak relationship with atmospheric pressure, a micrometeorological parameter that is slightly related with TGM in the Almadén mining district (Esbri *et al.* 2016). Other

micrometeorological parameters involved in wet and dry deposition processes (relative humidity, rain rate and wind speed) appear as a subgroup (A2). The rest of the parameters belong to a different group (B) and this includes TGM levels on average or sum per day, which are related with temperature and dew point (subgroup B1) as one would expect (Esbri *et al.* 2016). Solar radiation and UV radiation make up the fourth subgroup (subgroup B2). Overall, group A involves Hg in leaves and micrometeorological parameters related with deposition processes, while group B includes TGM levels and micrometeorological parameters involved in emission processes. This implies that olive-tree leaves are involved only in deposition processes, and it is necessary to take in consideration that emissions from the leaves should be several orders of magnitude lower than those from polluted soils and, consequently, their influence on local TGM levels should not be appreciable.

### Discussion

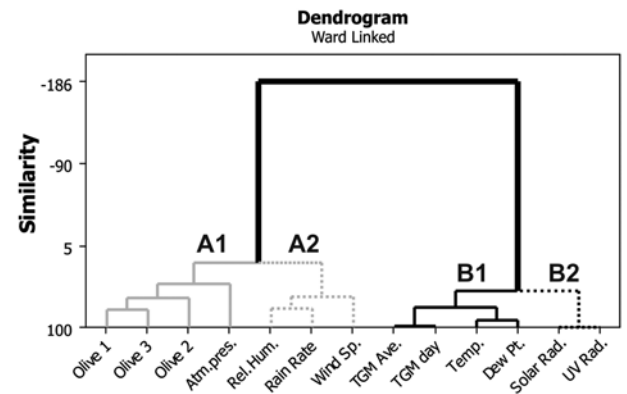
Numerous researchers in recent years have focused their attention on the characterization of Hg dynamics in the soil-plant-atmosphere system. It is paradoxical to find that in recent manuscripts the idea that Hg uptake from soils can occur either through the roots or through the shoots, thus promoting the belief that these two routes are preferential, and one is exclusive of the other. A rapid search on a scientific basis shows that the root uptake route is preferential according to Liu *et al.* (2017) or Ahammad *et al.* (2018), while others like Assad *et al.* (2016), Kowalski & Frankowski (2016), Zheng *et al.* (2017), Barquero *et al.* (2017) and Esbri *et al.* (2018) exclude the root path and consider only the aerial route. Pellegrini *et al.* (2017) considered root uptake as preferential in halophytes and showed poor translocation rates to avoid Hg toxicity. Alcantara *et al.* (2017) drew similar conclusions for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) growing on polluted mine tailings, a laboratory test with Hg present in soils. The conclusions reached in all of these studies were from monitoring work and not from laboratory experimentation. Unfortunately, the soil-plant-atmosphere system is complicated when Hg is the target element; these complications restrict the interpretation of data in terms of correlations or bioconcentration factors, at least in a direct way. In many cases, Hg is present in soils as unavailable compounds or, alternatively, the available fraction is a minor component (Higuera *et al.* 2015; Campos *et al.* 2018), but its emission capacity remains high (e.g. cinnabar or elemental mercury). The consequence of this is that TGM levels around the aerial part of the plant can be high, which makes leaf uptake difficult to interpret, while non-available compounds in soils can be also high, and some of them can be transferred by diffusion to the apoplast of the roots (Marschner 2012). In any case, the mobility through the Caspari Band and its subsequent translocation through the xylem would be very weak in most cases. Consideration of all factors in the soil-plant-atmosphere system implies the need for a knowledge not only of Hg data in



## Mercury uptake

**Table 2.** Pearson correlation coefficients for all parameters in absorption experiments in the AWTP. Significant correlations ( $p < 0.02$ ) appear in bold.

	Olive 1	Olive 2	Olive 3	TGM Av	TGM day <sup>-1</sup>	Temp	Out Hum	Dew Pt	Wind Sp	Atm press	Rain Rate	Solar Rad	UV Rad
Olive 2	<b>0.51</b>												
Olive 3	<b>0.59</b>	0.26											
TGM Av	-0.18	-0.15	<b>-0.38</b>										
TGM day <sup>-1</sup>	-0.23	-0.16	<b>-0.42</b>	<b>0.98</b>									
Temp	-0.26	<b>-0.39</b>	-0.30	<b>0.78</b>	<b>0.73</b>								
Out Hum	0.17	0.29	0.25	<b>-0.72</b>	<b>-0.66</b>	<b>-0.95</b>							
Dew Pt	-0.32	<b>-0.42</b>	-0.28	<b>0.70</b>	<b>0.67</b>	<b>0.84</b>	<b>-0.63</b>						
Wind Sp	0.14	0.03	0.36	-0.04	-0.09	-0.09	0.15	0.01					
Atm press	0.12	0.31	0.03	-0.48	-0.42	<b>-0.65</b>	<b>0.56</b>	<b>-0.69</b>	-0.37				
Rain Rate	0.05	-0.17	0.16	-0.37	-0.36	-0.44	<b>0.57</b>	-0.15	0.56	-0.21			
Solar Rad	-0.15	-0.19	-0.12	0.57	0.50	<b>0.81</b>	<b>-0.84</b>	<b>0.58</b>	-0.04	<b>-0.72</b>	-0.35	<b>0.98</b>	
UV Rad	-0.11	-0.17	-0.05	0.51	0.43	<b>0.76</b>	<b>-0.78</b>	<b>0.58</b>	0.02	<b>-0.77</b>	-0.24	<b>0.93</b>	
ET	-0.23	-0.30	-0.26	<b>0.72</b>	0.66	<b>0.90</b>	<b>-0.93</b>	<b>0.74</b>	-0.08	<b>-0.67</b>	-0.43		<b>0.90</b>

**Fig. 5.** Dendrogram of main factors measured in this study, including factors related with (A) olive leaf mercury and (B) total gaseous mercury. Atm. Pres., atmospheric pressure; Rel. Hum., relative humidity; Wind Sp., wind speed; TGM Ave., average TGM; Temp., temperature; Dew Pt., dew point; Solar Rad., solar radiation; UV Rad., UV radiation.

soils, plants and the atmosphere, but also of Hg speciation data, pedological parameters, plant stress data, micrometeorological data and others. Furthermore, some of these parameters are interrelated and this creates synergies between them and makes the monitoring scenario a complex task. In addition to the above, one must consider laboratory experiments. Stamenkovic & Gustin (2009) confined *Rudbeckia hirta*, *Sorghastrum nutans*, *Andropogon gerardii*, and *Populus tremuloides* in a gas exchange chamber and measured Hg and CO<sub>2</sub> in light and dark conditions at 25% relative humidity. It was found that high levels of Hg in the atmosphere enhanced Hg deposition in plant leaf and, surprisingly, that this deposition occurred both in light and dark conditions, when stomas are closed. Rao & Dubey (1992) reported that uptake depends on trichoms density, which is extremely high in the case of olive-tree leaves. These two conclusions can provide an explanation for the Hg uptake of pine needles in a mining context (Barquero *et al.* 2017), or possibly the confinement of plants in the gas exchange chamber can lead to a bias in an undetermined way. The conditions in this chamber are quite different from those of a natural environment; atmospheric Hg levels and other conditions are constant in the box whereas variables in the field are chaotic, which makes it virtually impossible to predict differences in the responses of plants in the laboratory and in the field. In this scenario, on-site experimentation may provide a solution to this problem. The work described here has provided experimental data under real conditions. In the first stage, the variables were Hg in irrigation water and Hg in the atmosphere. When these two routes were present (AWTP location, Fig. 2A) it was evident that some of the mercury in irrigation water was being transferred to soils and roots, but the behaviour of vine leaves (Fig. 2B) was not as clear. In the next step, Hg was not present in the atmosphere during the process (Fig. 2C) and a clear increase was observed for Hg in vine leaves before 20 days of exposure and this was followed by a decrease, with higher contents observed in leaves watered with 50 µg L<sup>-1</sup> of Hg. These data indicate that Hg had been transferred from the irrigation water to the vine leaves, and that the atmospheric route could be preferential due to the higher atmospheric Hg levels emitted by wet soils, as can be seen from TGM measurements during irrigation and at noon, with calm winds (Fig. 2D); therefore, this part of the experiment failed, since the expected background Hg conditions were not reached. It was very difficult to isolate soils to avoid Hg emissions without affecting plant growth, since this process allowed a certain gas exchange between soil and atmosphere and, as a consequence, TGM levels in the experimental area were no longer background levels but moderately polluted levels.

The next step was to assess Hg uptake from the atmosphere only and this was achieved by placing olive trees at the AWTP and irrigating with mineral water that was free of Hg (Fig. 3A). The evolution of Hg contents in olive leaves showed a continuous Hg exchange at the leaf-atmosphere interface and this did not correlate with TGM or micrometeorological parameters. Stamenkovic & Gustin (2009) described Hg uptake as involving two processes: a reversible one such as an absorption through respiration processes (via stomata) and a non-reversible one such as sorption through the leaf cuticle. Olive-tree leaves in the AWTP underwent these two processes, but reversible processes seemed to be preferential, as evidenced by the wide range of THg concentrations (Fig. 3A). This finding has implications for studies that focus on translocation factors and considers that plant Hg uptake occurs via the roots (Pellegrini *et al.* 2017, for instance), while the presence of Hg in the aerial part can only be explained by translocation from roots and stems. Finally, Pellegrini *et al.* (2017) concluded that the plants did not translocate Hg from roots, even without a knowledge of the concentrations of atmospheric Hg in the local atmosphere and considering the possibility that leaves could be net emitters of Hg in a low TGM environment. For that reason, Hg concentrations in leaf tissues were lower than in roots.

In the third experimental stage, the same olive trees that had accumulated Hg from the atmosphere in the AWTP were placed in a real background site (Peñalsordo). A clear decrease in the Hg concentration in leaves (Fig. 4A) due to a desorption processes was observed, which implies that reversible processes are preferred over non-reversible processes.

## Conclusions

The work reported here concerned on-site experimentation with common plants (vines and olive trees) placed in polluted and non-polluted locations of Ciudad Real province (Spain). The main findings are as follows:

- (1) Data from an experimental setup with Hg only in irrigation water confirmed that plant Hg uptake via roots does occur – albeit as a minor route.
- (2) Data from experiments carried out with variable Hg concentrations in irrigation water and the atmosphere indicate that plant Hg uptake from the atmosphere is the preferential route in high TGM environments and that this involves a continuous exchange at the leaf-atmosphere interface.
- (3) Data from an environment free of atmospheric Hg during the experimentation suggest that plant Hg uptake could be a reversible process.

These three findings have implications for the use of plants as biomonitors or for phytoremediation purposes. A continuous exchange at the plant leaf-atmosphere interface implies that Hg contents in the leaf cannot be considered as being the result of a long exposure period to atmospheric Hg. This fact represents a limitation for one of the major advantages of biomonitoring, namely to obtain information about the presence of pollutants during long periods using only single measurements. Furthermore, the ability of plants to exchange Hg with the atmosphere implies that Hg taken up from soil can be re-emitted into the atmosphere, thus producing the unwanted effect of increased soil Hg mobility. In addition, it is necessary to take in consideration TGM monitoring in all studies aimed at evaluating the soil-plant system when mercury is present.

These conclusions refer to specific conditions obtained in a mercury-mining environment with Mediterranean climatic conditions; further research should confirm them at different latitudes or in pollution contexts (chloralkali plants or coal combustion related sites).

**Acknowledgements** Dr Neil Thompson is thanked for improving the English of this paper.

**Funding** This work was funded by the Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación (CGL2015-67644-R)

*Scientific editing by Jaume Bech Borrás and Gwendy Hall*

## References

- Ahammad, S.J., Sumithra, S. & Senthilkumar, P. 2018. Mercury uptake and translocation by indigenous plants. *Rasayan Journal of Chemistry*, **11**, 1–12.
- Alcantara, H.J.P., Doronila, A.I. & Kolev, S.D. 2017. Phytoextraction potential of *manihot esculenta crantz.* (Cassava) grown in mercury- and gold-containing biosolids and mine tailings. *Minerals Engineering*, **114**, 57–63.
- Antoniadis, V., Shaheen, S.M., Boersch, J., Frohne, T., Du Laing, G. & Rinklebe, J. 2017. Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany. *Journal of Environmental Management*, **186**, 192–200.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M. & Tatin-Froux, F. 2016. Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere*, **146**, 1–7.
- Bargagli, R. 1995. The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. *Science of the Total Environment*, **176**, 121–128.
- Barquero, J.I., Rojas, S., Esbri, J.M., García-Noguero, E.M. & Higuera, P. 2017. Factors influencing mercury uptake by leaves of stone pine (*Pinus pinea* L.) in Almadén (Central Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0446-8>.
- Beckers, F. & Rinklebe, J. 2017. Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **47**, 693–794.
- Bose-O'Reilly S., Schierl R., Nowak D., Siebert U., William J.F., Owi F.T. & Ismawati Y. 2016. A preliminary study on health effects in villagers exposed to mercury in a small-scale artisanal gold mining area in Indonesia. *Environmental Research*, **149**, 274–281.
- Campos, J., Esbri, J.M. *et al.* 2018. Does mercury presence in soils promote their microbial activity? The Almadenejos case (Almadén mercury mining district, Spain). *Chemosphere*, **201**, 799–806.
- Castro-González, M.I. & Méndez-Armenta, M. 2008. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**, 263–271.
- Clarkson, T.W. & Magos, L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**, 609–662.
- Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J. & Pirrone, N. 2013. Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects. *Environmental Science and Technology*, **47**, 4967–4983.
- Ericksen, J.A., Gustin, M.S., Schorran, D.E., Johnson, D.W., Lindberg, S.E. & Coleman, J.S. 2003. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmospheric Environment*, **37**, 1613–1622.
- Esbri, J.M., Martínez-Coronado, A. & Higuera, P.L. 2016. Temporal variations in gaseous elemental mercury concentrations at a contaminated site: Main factors affecting nocturnal maxima in daily cycles. *Atmospheric Environment*, **125**, 8–14.
- Esbri, J.M., Căcovean, H. & Higuera, P. 2018. Usage Proposal of a common urban decorative tree (*Salix alba* L.) to monitor the dispersion of gaseous mercury: A case study from Turda (Romania). *Chemosphere*, **193**, 74–81.
- García-Ordiales, E., Loredó, J., Covelli, S., Esbri, J.M., Millán, R. & Higuera, P. 2017. Trace metal pollution in freshwater sediments of the world's largest mercury mining district: Sources, spatial distribution, and environmental implications. *Journal of Soils and Sediments*, **17**, 1893–1904.
- Gnamuš, A., Byrne, A.R. & Horvat, M. 2000. Mercury in the soil-plant-deer-predator food chain of a temperate forest in Slovenia. *Environmental Science and Technology*, **34**, 3337–3345.
- Gong, Y., Nunes, L.M. *et al.* 2018. Bioaccessibility-corrected risk assessment of urban dietary methylmercury exposure via fish and rice consumption in China. *Science of the Total Environment*, **630**, 222–230.
- Göthberg, A. & Greger, M. 2006. Formation of methyl mercury in an aquatic macrophyte. *Chemosphere*, **65**, 2096–2105.
- Greger, M. & Dabrowska, B. 2010. Influence of nutrient level on methylmercury content in water spinach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**, 1735–1739.
- Harada, M. 1995. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, **25**, 1–24.
- Harris, H.H., Pickering, I.J. & George, G.N. 2003. The chemical form of mercury in fish. *Science*, **301**, 1203.
- Hernández, A., Jébrak, M., Higuera, P., Oyarzun, R., Morata, D. & Munhá, J. 1999. The Almadén mercury mining district, Spain. *Mineralium Deposita*, **34**, 539–548.
- Higuera, P., Amorós, J.A., Esbri, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez de los Reyes, C. & Moreno, G. 2012. Time and space variations in mercury and other trace

## Mercury uptake

- element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Geochemical Exploration*, **123**, 143–151.
- Higuera, P., Oyarzun, R. *et al.* 2014. A compilation of field surveys on gaseous elemental mercury (GEM) from contrasting environmental settings in Europe, south America, south Africa and China: Separating fads from facts. *Environmental Geochemistry and Health*, **36**, 713–734.
- Higuera, P., Fernández-Martínez, R., Esbrí, J.M., Rucandio, I., Loredó, J., Ordoñez, A. & Álvarez, R. 2015. Mercury soil pollution in Spain: A review. In: Jiménez, E., Cabañas, B. & Lefebvre, G. (eds) *Environmental Chemistry of Pollutants and Wastes I: Environment, Energy and Climate Change*. Springer, Alemania, 135–158.
- Higuera, P.L., Amorós, J.Á., Esbrí, J.M., Pérez de los Reyes, C., López-Berdonez, M.A. & García-Navarro, F.J. 2016. Mercury transfer from soil to olive trees. A comparison of three different contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 6055–6061.
- Kowalski, A. & Frankowski, M. 2016. Seasonal variability of mercury concentrations in soil, buds and leaves of *Tilia platyphyllos* and *Acer platanoides* in central Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 9614–9624.
- Lindberg, S.E., Jackson, D.R. & Huckabee, J.W. 1979. Atmospheric emission and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almadén mercury mine. *Journal of Environmental Quality*, **8**, 572–578.
- Liu, Z., Wang, L.-., Xu, J., Ding, S., Feng, X. & Xiao, H. 2017. Effects of different concentrations of mercury on accumulation of mercury by five plant species. *Ecological Engineering*, **106**, 273–278.
- Llanos, W., Kocman, D., Higuera, P. & Horvat, M. 2011. Mercury emission and dispersion models from soils contaminated by cinnabar mining and metallurgy. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 3460–3468.
- Marschner, P. 2012. *Nutrition of higher plants*. 3rd edn. Academic Press, Cambridge, USA.
- Martínez-Coronado, A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Llanos, W. & Higuera, P. 2011. Sampling high to extremely high Hg concentrations at the Cerco de Almadenejos, Almadén mining district (Spain): The old metallurgical precinct (1794 to 1861AD) and surrounding areas. *Journal of Geochemical Exploration*, **109**, 70–77.
- Mergler, D., Anderson, H.A., Chan, L.H.M., Mahaffey, K.R., Murray, M., Sakamoto, M. & Stern, A.H. 2007. Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern. *Ambio*, **36**, 3–11.
- Millán, R., Gamarra, R. *et al.* 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of the Total Environment*, **368**, 79–87.
- Millán, R., Schmid, T. *et al.* 2011. Spatial variation of biological and pedological properties in an area affected by a metallurgical mercury plant: Almadenejos (Spain). *Applied Geochemistry*, **26**, 174–181.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M. & Higuera, P. 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: One of the most contaminated sites on earth. *Environmental Geochemistry and Health*, **28**, 487–498.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L. & Amyot, M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 543–566.
- Overesch, M., Rinklebe, J., Broll, G. & Neue, H.U. 2007. Metals and arsenic in soils and corresponding vegetation at Central Elbe river floodplains (Germany). *Environmental Pollution*, **145**, 800–812.
- Pellegrini, E., Petranich, E., Acquavita, A., Canário, J., Emili, A. & Covelli, S. 2017. Mercury uptake by halophytes in response to a long-term contamination in coastal wetland salt marshes (northern Adriatic Sea). *Environmental Geochemistry and Health*, **39**, 1273–1289.
- Rao, M.V. & Dubey S.P. 1992. Occurrence of heavy metals in air and their accumulation by tropical plants growing around an industrial area. *Science of the Total Environment*, **126**, 1–16.
- Sholupov, S., Pogarev, S., Ryzhov, V., Mashyanov, N. & Stroganov, A. 2004. Zeeman Atomic Absorption Spectrometer RA-915+ for Direct Determination of Mercury in Air and Complex Matrix Samples. *Fuel Process Technology*, **85**, 473–485.
- Stamenkovic, J. & Gustin, M.S. 2009. Nonstomatal v. stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environmental Science and Technology*, **43**, 1367–1372.
- Tejero, J., Higuera, P.L., Garrido, I., Esbrí, J.M., Oyarzun, R. & Español, S. 2015. An estimation of mercury concentrations in the local atmosphere of Almadén (Ciudad Real Province, South Central Spain) during the twentieth century. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 4833–4841.
- Weigelt, A., Ebinghaus, R. *et al.* 2016. Tropospheric mercury vertical profiles between 500 and 10 000 m in Central Europe. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **16**, 4135–4146.
- Zheng, N., Wang, Q. & Zheng, D. 2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *Science of the Total Environment*, **383**, 81–89.
- Zheng, S.A., Wu, Z., Chen, C., Liang, J., Huang, H. & Zheng, X. 2017. Evaluation of leafy vegetables as bioindicators of gaseous mercury pollution in sewage-irrigated areas. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**, 413–421.

## **Anexo B.**

Campos, J., Esbrí, J.M, Madrid, M.M., **Naharro, R.**, Peco, J., García-Noguero, E.M., Amorós, J.A., Moreno, M.M., Higuera P. (2018). Does mercury presence in soils promote their microbial activity? The Almadenejos case (Almadén mercury mining district, Spain). *Chemosphere*, 201, 799-806.





## Does mercury presence in soils promote their microbial activity? The Almadenejos case (Almadén mercury mining district, Spain)



J.A. Campos <sup>a, b</sup>, J.M. Esbrí <sup>a, c</sup>, M.M. Madrid <sup>c</sup>, R. Naharro <sup>a, c</sup>, J. Peco <sup>a, b</sup>,  
E.M. García-Noguero <sup>a, c</sup>, J.A. Amorós <sup>a, b</sup>, M.M. Moreno <sup>b</sup>, P. Higuera <sup>a, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Geología Aplicada, IGeA. Universidad de Castilla-La Mancha. Plaza de Manuel Meca, 1, 13400, Almadén, Ciudad Real, Spain

<sup>b</sup> Escuela de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha. Ronda de Calatrava, 7, 13071, Ciudad Real, Spain

<sup>c</sup> Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén. Plaza de Manuel Meca, 1, 13400, Almadén, Ciudad Real, Spain

### HIGHLIGHTS

- Quantification of Hg chemical species in a metallurgical precinct.
- Relationships between Hg chemical species in soil and plants and atmosphere.
- Quantification of dehydrogenase activity in relation to Hg contents.
- Mercury presence in the soils not promoted neither favors microbial activity.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 November 2017

Received in revised form

2 February 2018

Accepted 26 February 2018

Available online 27 February 2018

#### Keywords:

Dehydrogenase activity

Mercury

Toxicity

Methylation

Soil

Plants

### ABSTRACT

Mercury is considered a very toxic element and important efforts are currently being made aimed at reduce or even eliminating its usage. Despite this trend, there are still sites where contamination by this metal is very marked, especially in the mining environment of Almadén where it has been exploited for thousands of years. The several forms in which Hg occurs in the soil interact differently with the organisms that live in/on it. The soil is a place where many biotic and abiotic variables act together. Through a detailed study of the edaphic characteristics of a decommissioned metallurgical enclosure, the presence of different chemical forms of Hg, the study of microbial activity (DHA) and, finally, parameters of the vegetation cover, such as specific distribution and biomass, we have tried to elucidate the effect of the presence of Hg in this precinct with a very high Hg pollution. The obtained results showed the affection patterns by which the different measured parameters vary, with special incidence to the microbial activity of the topsoil and to the specific distribution of the plants found in the studied area. The statistical multivariate analysis showed that significant correlations have been found between soil Hg fractions and between Hg fractions in plants; furthermore, soil conditions seem to be not related with Hg transfer from soils to plants. Biomass and DHA data indicate that the studied area is not affected by the presence of Hg species and lacks the expected toxic effects on the living organisms.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Over the last few years, the presence of mercury (Hg) in the environment has raised a great interest among the scientific community, which is perceived in the extraordinary number of papers devoted to its study in relation to the environment: 8448

manuscripts in the period 2000–2017 (Scopus). Mercury naturally appears in three broad categories with different pharmacokinetic properties:  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Hg}^+$ . Elemental Hg ( $\text{Hg}^0$ ) represents the first one, and it is usually known as gaseous elemental mercury (GEM) if it is in the atmosphere or as metallic Hg if it is in liquid state. This last form represents a certain toxicological threat due to its high vapor pressure and low solubility in water (less than  $25 \text{ ng L}^{-1}$  at room temperature) (USEPA, 1997) and lipids. Ionic forms include  $\text{Hg}^{2+}$  (mercuric) and  $\text{Hg}^+$  (mercurious); Hg forms inorganic and organic compounds, due to the strong tendency of these cations to react with anions such as  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  or  $\text{OH}^-$  and with

\* Corresponding author. Instituto de Geología Aplicada, IGeA. Universidad de Castilla-La Mancha. Plaza de Manuel Meca, 1, 13400, Almadén, Ciudad Real, Spain.  
E-mail address: [pablo.higuera@uclm.es](mailto:pablo.higuera@uclm.es) (P. Higuera).

humic acids. The toxicity of each chemical Hg species varies from low ( $\text{Hg}^0$  and other inorganic compounds) to high (inorganic  $\text{Hg}^{2+}$  and monomethyl Hg). Monomethylated Hg compounds represent a major environmental threat because of their higher toxicity and their relationship with soil organic matter, implying transformations that may drive these compounds into human food chain.

Worldwide production of primary Hg comes fundamentally from sulphide ores such as cinnabar, with a common hydrothermal origin, while the main anthropogenic sources of Hg pool have been mining and smelting facilities, burning of fossil fuels, industrial production of sodium hydroxide and chlorine through electrolysis, and wastes incineration.

Almadén (Ciudad Real province, South Central Spain) is the center of the most important mercury mining district in the world (Hernández et al., 1999). Mercury has been present in the atmosphere at extremely high concentrations during industrial times, but nowadays, after the closure of the mine and the cessation of metallurgical ore processing, concentrations have decreased to levels that do not cause concern (Tejero et al., 2015). Almadenejos is a small village (456 inhabitants, INE 2015) situated some 11 km to the ESE of Almadén and it is part of the Almadén mercury mining district: three mercury mines of some importance have been exploited in its surroundings in the last five Centuries (until the closure of the El Entredicho open pit in 1997), and a metallurgical precinct is located immediately to the North of the urban area (Martínez-Coronado et al., 2011; Millán et al., 2011). In this area of Almadenejos, due to the presence of the unreclaimed metallurgical precinct and other minor sources, the presence of atmospheric mercury is markedly higher than in Almadén (Martínez-Coronado et al., 2011).

Factors affecting the mobility of inorganic Hg in the soils include redox potential, soil reactivity (pH), soil organic matter (SOM) content and chloride ion concentration (Schlüter, 1993; Steinnes, 1995; Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007). Elemental mercury ( $\text{Hg}^0$ ) is stable in the presence of sulphide species under strongly reducing conditions; however, it will precipitate as Hg sulphide at increasing redox potential (Steinnes, 1995). Although Hg can form inorganic compounds in the mercurous form ( $\text{Hg}^+$ ), the  $\text{Hg}^{2+}$  is much more stable in the soil environment and is normally found complexed with chlorides, sulphides, or organic matter. Due to its extraordinary reactivity,  $\text{Hg}^{2+}$  is rarely found in soil solution under natural conditions, being the major fraction bound to soil mineral particles or soil organic matter (Steinnes, 1995; ATSDR, 1999).

Inorganic Hg can be methylated by sulphate-reducing bacteria, and in a lesser extent by methanogenic microorganisms, usually as a co-metabolic product (Gray et al., 2004; Parks et al., 2013). In the topsoil, about 1–20% of total Hg is found in the methylated form, while the remaining is mainly as  $\text{Hg}^{2+}$  (Obrist, 2012; Grigal, 2003; Skjölberg et al., 2003).

The phytoavailability and toxicity of Hg in the soil–plant system depends on its chemical state and the relative sorption to mineral and organic particles (Ulrich et al., 2001). Plants differ in their ability to uptake Hg and they can develop a tolerance to high concentrations in contaminated sites, resulting in elevated concentrations in roots and aerial parts, as compared with natural, non-polluted soils (Molina et al., 2006).

The major proportion of Hg uptake by plants comes from the atmosphere, while direct caption from soils via roots represents a tiny proportion (less than 5%) that even could be neglected in many cases (Stamenkovic and Gustin, 2009). Generally speaking, the availability to plants of Hg present in the soil is low, and it usually accumulates in roots, pointing that the roots serve as a barrier to Hg uptake (Patra and Sharma, 2000; Pellegrini et al., 2017). Therefore, we can assume that the presence of Hg in plants is due to the

capture carried out by leaves, being soil emissions the precedence of such gaseous Hg, as described in Almadén environment (Higueras et al., 2016; Barquero et al., 2017).

Mercury accumulated in plants can cause phytotoxicity and changes in metabolic processes, including nutrient uptake, water status or photosynthesis. Phytochelatin (PCs), a metal-chelator peptide, usually occur in response to the abiotic stress induced by the presence of high Hg levels in plant tissues (Dago et al., 2014). Conversely, PCs appears directly related with Hg presence in Almadén soils, highlighting the importance of thiol compounds in Hg capture process from soils.

Soil dehydrogenases (EC 1.1.1.) belong to the class of oxidoreductases (Gu et al., 2009) and quantitatively play a crucial role in the oxidation of substrates, mainly soil organic matter, by transferring hydrogen and electrons to acceptors, mainly inorganic. The determination of the dehydrogenase activity (DHA) could be considered as a measurement of the metabolic state of the microorganisms living in the superficial layers of the soil, thus it can be used as a sensitive and reliable bioindicator connected to the availability of resources and health of the whole ecosystem (Watts et al., 2010; Wolinska and Stepniewska, 2012). DHA depends on a variety of factors, including moisture, pH, temperature, presence of oxygen, oxidation-reduction potential, organic matter quality and quantity, depth, presence of xenobiotics and, finally, heavy metals, all of them key factors to the microorganisms' growth (Karaca et al., 2011).

The Almadén Hg mining district (AMMD) is worldwide known as the source of one third of Hg production in historic times (Hernández et al., 1999). It comprises several ore deposits, including the major Almadén mine and other minor deposits that were partially clustered around Almadenejos: El Entredicho-Valdeazogues-Las Minetas area, La Vieja Concepción mine, la Nueva Concepción mine and Almadenejos decommissioned metallurgical precinct (ADMP) active in the 18th and 19th centuries (Hernández et al., 1999). This ADMP has been intensely studied by different authors and scopes (Martínez-Coronado et al., 2011; Millán et al., 2011; Higueras et al., 2012; Carrasco-Gil et al., 2013; Amorós et al., 2014; Dago et al., 2014), due to its interest as a source of Hg pollution. ADMP is a relatively extend area (some 32,400 m<sup>2</sup>) enclosed by a high stonewall, built to avoid Hg robbery during its activity. Inside the precinct, five metallurgical furnaces were built, and evidences of activity were found in four of them. Operation in these furnaces was based on calcination of the cinnabar ( $\text{HgS}$ ), fueled by wood; the vapors generated passed through pipes made of clay, where the Hg was picked up after condensation. High amounts of Hg vapors were released to the atmosphere due to the inefficiency of the system and this result in an extremely polluted broad surface covered by plants resilient enough to the high levels of Hg in the soils (Martínez-Coronado et al., 2011).

Relationships between the levels of Hg in soils and plants have been studied previously in the ADMP (Martínez-Coronado et al., 2011; Millán et al., 2011) but without considering the different species by which this element naturally occurs. The present work is also focused on this relationship, but considering the biological parameters of the soil that could play a crucial role in this interaction. Besides this, we present here a complete Hg speciation dataset for soils and plants, in order to check the main metal transport ways, and the possible contribution of atmospheric Hg to overall cycle.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and sampling

Plant and soil samples were collected from the ADMP, an

enclosure of  $180 \times 190$  m surrounded by a 4 m high wall, near Almadenejos, a small town belonging to the AMMD ( $38^\circ 44' 26.02''/4^\circ 42' 42.97''$ ) (Fig. 1). This site may be considered very peculiar due to its high-grade Hg contamination (Martínez-Coronado et al., 2011) and could be considered as a special area to study the effects that different species of Hg could exert on the microbiological activity of the soil and on the resident vegetation.

The enclosed area was subdivided in 12 sectors (Fig. 1). The soil samples (2 kg) were taken from the topsoil (A horizon), dried at room temperature, sieved (<2 mm) and stored at  $4^\circ\text{C}$  in labeled plastic bags until they were used for the different analytical determinations. Vegetation species, biomass and plant height data were determined from samples randomly distributed in every sector with the help of a  $25 \times 25$  cm frame. After the determination and quantification of the different plant species of each sample (Fig. 2), the plants were cut to ground level, packed in paper envelopes, carried to the laboratory, dried at  $60^\circ$  during 72 h and finally ground and stored before analysis.

## 2.2. Soil physico-chemical characterization

The standard parameters of soil characterization were determined taking into account the methodology for soil samples reported by USDA (USDA, 1996) (Table 1). The soil organic matter (SOM) content was determined according to Walkley and Black (1934). This method is based on the wet oxidation of a soil sample with potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) in acid medium.

Determination of Hg concentrations in the soil and plant samples was carried out using a LUMEX RA-915+ device equipped with a PYRO-915+ attachment for complex solid compounds. This

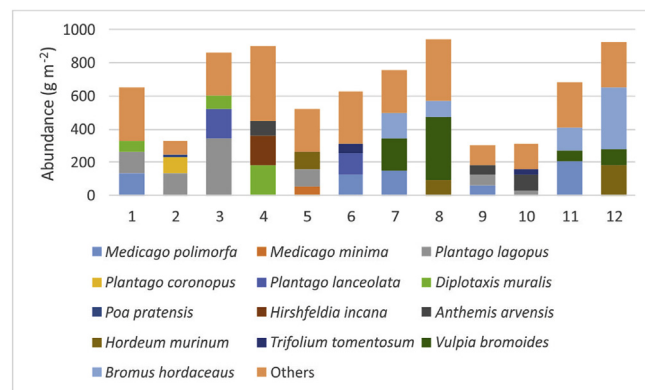


Fig. 2. Abundance in terms of plant biomass of plant species samples on ADMP. Distribution of sectors 1 to 12 can be observed in Fig. 3.

device uses the technique of Atomic Absorption Spectrometry with Zeeman effect for direct analysis of solid samples by electrothermal vaporization at  $800^\circ\text{C}$  (Sholupov et al., 2004). Quality control was achieved by using CRMs for soils (NIST 2710–NIST 2710a) and for biological samples (CRM020-050 – BCR 60). The detection limit of the technique for solid samples is  $0.5 \text{ ng g}^{-1}$ .

Identification of Hg compounds on soil and plants was performed by thermal speciation (Biester and Scholz, 1997). The main advantage of this technique is the possibility to get directly speciation information, in a single analysis and without changes in Hg compounds during the determination. Although this method was early developed by Biester and Scholz (1997), recent references describe the methodology applied on this work, especially Rumayor et al. (2016), an intercomparison paper that found that thermal speciation was a truly reliable method. The equipment used on this work was a Lumex RA-915 + Atomic Absorption Spectrometer with a PYRO-915 pyrolysis attachment. The temperature increase was  $0.74^\circ\text{C s}^{-1}$ , during 840 s at  $3 \text{ L min}^{-1}$ . Pure compounds ( $\text{Hg}^0$ , cinnabar, metacinnabar and schuetteite) used as a reference were produced in IGeA laboratories by dilution on milled sand. A soil with Hg bound to humic acid was used as a reference too. Thermal speciation data included soil total Hg ( $\text{Soil}_{\text{THg}}$ ), soil leachable Hg ( $\text{Soil}_{\text{LHg}}$ ), soil Hg bound to humic acids ( $\text{Soil}_{\text{ACHg}}$ ), soil cinnabar Hg ( $\text{Soil}_{\text{CbHg}}$ ), plant Hg bound to organic matter ( $\text{Plant}_{\text{OMHg}}$ ), plant cinnabar Hg ( $\text{Plant}_{\text{CbHg}}$ ) and total gaseous Hg (TGM).

## 2.3. Dehydrogenase activity (DHA)

Dehydrogenase activity in the local soils was assayed using the method described by Casida et al. (1964) and Casida (1977), modified by Barajas (2008) and Montejo et al. (2012). Dehydrogenase converts 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to formazan. The homogenized soil sample (3 g) was placed in a test tube ( $15 \times 120$  mm) mixed with 1.25 mL of aqueous treatment and then was incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 96 h; later, the substrate (3% v/w TTC) was added and the tubes were incubated at  $35^\circ\text{C}$  for 24 h. The samples were vortexed, filtered using methanol as an extractant agent and measured in a UV–visible spectrophotometer (Biochrom-Libra) at  $485 \text{ nm}$ . The data units were  $\mu\text{g TPF g}_{\text{soil}}^{-1} \text{ day}^{-1}$ .

## 2.4. Statistical data treatment

Data treatment of all parameters considered consists in a normalization prior to a cluster analysis with similarity as distance between groups and using Ward linkage. Statistical software used was Minitab 17.

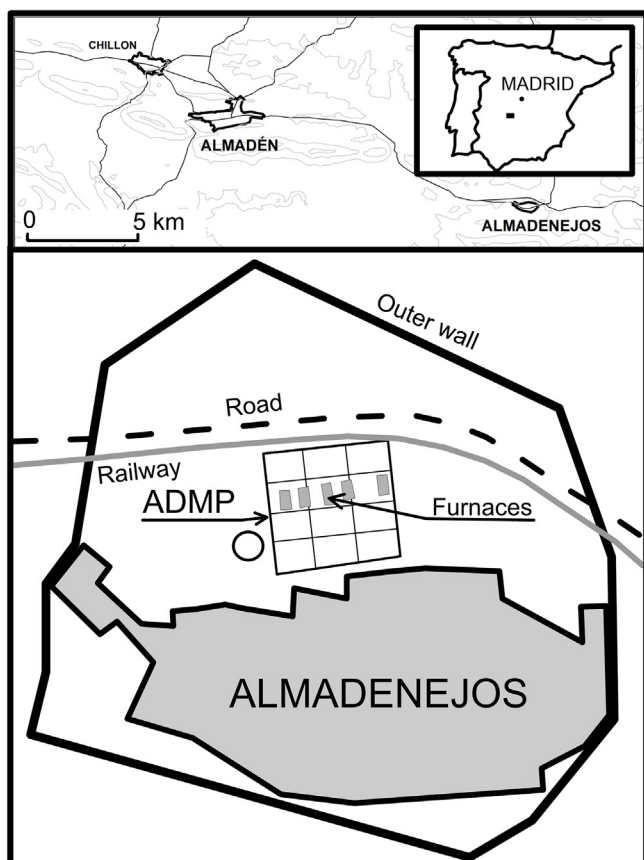


Fig. 1. Location of Almadenejos decommissioned metallurgical precinct (ADMP).

**Table 1**

Statistical summary of the main parameters studied on this work. Abbreviations: SD (standard deviation); GM (geometric mean); THg (total mercury); LHg (leachable mercury); AcHHg (mercury bound to humic acids); CbHg (mercury as cinnabar); OMHg (Hg bound to organic matter) and TGM (total gaseous mercury); EC (electric conductivity); SOM (soil organic matter); DHA (dehydrogenase activity).

	Units	Average	Minimum	Maximum	SD	GM
<b>Soil dataset</b>						
Soil THg (UCLM data)	mg kg <sup>-1</sup>	5105	55	11,121	3916	2694
Soil THg (this work)	mg kg <sup>-1</sup>	4068	197	9200	2903	2527
Soil LHg	mg kg <sup>-1</sup>	3	0	21	7	0
Soil AcHHg	mg kg <sup>-1</sup>	1967	69	5040	1882	845
Soil CbHg	mg kg <sup>-1</sup>	2125	128	5120	1809	1316
pH		7	6	8	1	7
EC	μS cm <sup>-1</sup>	201	51	295	77	183
SOM	%	6	5	7	1	6
DHA	μg TPF g <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	484	269	908	194	451
<b>Plant dataset</b>						
Plant THg	mg kg <sup>-1</sup>	47	1	310	91	10
Plant OMHg	mg kg <sup>-1</sup>	18	0	150	42	3
Plant CbHg	mg kg <sup>-1</sup>	30	0	171	53	7
Height	mm	501	494	507	5	501
Biomass	g	697	306	1372	318	630
<b>Atmosphere dataset</b>						
TGM	ng m <sup>-3</sup>	286	39	1296	420	130

### 3. Results and discussion

Data corresponding to extremely high concentration of Hg and methylmercury (MeHg) in this area were reported by Gray et al. (2004), particularly from the ruins of the metallurgical furnaces (Fig. 1). Molina et al. (2006) and Millán et al. (2006) studied the Hg contents in plants from the whole AMMD, including the ADMP; in particular, Millán et al. (2006) found the highest concentrations on total exchangeable and available Hg in these soils, as well as the second highest concentrations of water soluble Hg for the whole AMMD. Two local plant species (*Marrubium vulgare* and *Cynoglossum cheirifolium*) were analyzed and the maximum Hg content was measured with respect to plants from the rest of AMMD. Later, Martínez-Coronado et al. (2011) and Millán et al. (2011) studied in detail the ADMP. Millán et al. (2011) studied the area through a transect in which two biological parameters were analyzed (substrate induced respirometry and soil microbial biomass) concluding that Hg has a low incidence in the soil microbiological activity.

In the present work, total Hg in soils reached average values of 4068 mg kg<sup>-1</sup> (Table 1). These figures are well above the background values of 0.02 mg kg<sup>-1</sup> established for Spain by IGME (2012), and notoriously higher than the maximum level found by other authors in AMMD: 2695 mg kg<sup>-1</sup> in Molina et al. (2006) and 1710 mg kg<sup>-1</sup> in Millán et al. (2006). Concerning the thermal speciation, an important proportion of this Hg appeared as cinnabar (2125 mg kg<sup>-1</sup>), while only 1967 mg kg<sup>-1</sup> corresponded to Hg bound to humic acids; only a minor part of this fraction was leachable Hg (3 mg kg<sup>-1</sup> on average). Millán et al. (2006) found similar values for soluble Hg concentrations in ADMP (1.04 mg kg<sup>-1</sup>), and Millán et al. (2013) described that this fraction represents only 0.2% of total Hg (0.0003–0.4% in this work). Despite these low proportions of leachable Hg fraction, this amount is still notoriously high, specially focusing the attention in the range (0.002–20.84 mg kg<sup>-1</sup>).

Total Hg concentrations in plant tissues reached 47 mg kg<sup>-1</sup> on average. Values slightly higher than those were found in soils (LHg), but most of them (30 mg kg<sup>-1</sup>) corresponded to cinnabar, probably adhered as external pollution on the trichome of stems and leaves (Rao and Dubey, 1992), while the fraction of Hg bound to organic matter represented less than 40% of cinnabar fraction. It is important to remark that these Hg contents in plants corresponded to whole plant samples.

Bioconcentration factors (BF) usually express the simple

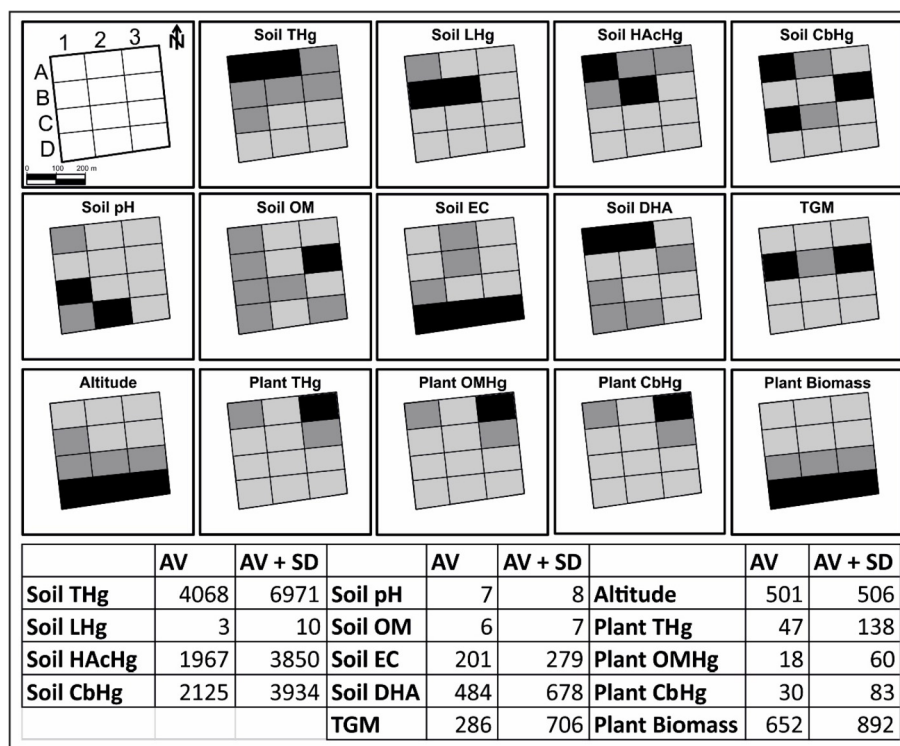
Plant<sub>THg</sub>/Soil<sub>THg</sub> ratio, and for the studied samples, figures obtained are very low (0.001–0.015); however, if we consider plant Hg fraction bound to organic matter (Plant<sub>OMHg</sub>) vs. soil leachable Hg fraction (Soil<sub>LHg</sub>) expressed as Plant<sub>OMHg</sub>/Soil<sub>LHg</sub>, we get higher figures (0.2–370), with nine sectors above unity (Fig. 3). This suggests that in ADMP, Hg fraction in plant tissues (Plant<sub>OMHg</sub>) by far exceeds the soil leachable fraction, thus the Hg bioavailable fraction should be bound to humic acids. Furthermore, if we consider a new BF as a ratio (Plant<sub>OMHg</sub>/Soil<sub>AcHHg</sub>) between plant Hg fraction bound to organic matter (Plant<sub>OMHg</sub>) and soil Hg fraction bound to humic acids (Soil<sub>AcHHg</sub>), we obtain figures in the range of 0.0003–0.05, showing that Hg transferred from bioavailable fraction in soil to plant tissues is very low as compared to other fractions.

Mercury concentration in the atmosphere reaches some 300 ng m<sup>-3</sup> during diurnal hours, when dilution is maximum in the lower layers (tens of meters) of the atmosphere (Esbri et al., 2016). Nowadays, these total gaseous Hg (TGM) levels in ADMP represent the highest TGM levels in AMMD due to the inexistent remediation actions in ADMP with the polluted soils exposed to the sunlight and without the cover that could prevent gaseous Hg emissions.

Dehydrogenase activity measured in the studied soils showed an average value of 484 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>. This figure is sensitively lower than DHA measured on compost (~1200 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>) by Shahzad et al. (2017), but higher than that measured in other contaminated soils (110 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>) by Meier et al. (2017) and also higher than the range described by Mukhopadhyay and Maiti (2010) for restored soils from mine sites (140–580 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>). Hinojosa et al. (2004) reported DHA values for soils from Aznalcollar (Seville) area, affected by an important spill of sulphides; these authors found DHA values of 1700 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for the non-polluted soils; 1270 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for reclaimed area; and 70 μg TPF g<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for heavy metals polluted soils. Therefore, DHA values in ADMP are higher than those measured in polluted soils, but lower than those measured in the reclaimed area, suggesting that the presence of Hg could produce some inhibition on microbial activity.

The presence of heavy metals in soils, even though they come from the natural mineral composition, could have negative impact on the biogeochemical processes linked to microbial activity and soil processes (Pan and Yu, 2011). It can be assumed that the presence of heavy metals in the soil negatively affects the enzyme activity, affecting the structure of the amino acids chain or the enzyme-substrate complexation or even interacting in the genetic





**Fig. 3.** Distribution of the main parameters measured from soils, plants and atmosphere over ADMP. Range of values < average (AV) appears as light gray; range between average - average + SD appears as grey; range of values up to average + SD appears as black color.

processes of protein synthesis (Pan and Yu, 2011). Concerning the presence of mercury, no references have been found in the scientific literature; this study demonstrates for the first time that this element, present in the studied soils in a variety of chemical species, does not affect the DHA, and thus neither affects the microbial community responsible of this enzymatic activity.

### 3.1. Distribution of soil-plant-atmosphere parameters on ADMP

Fig. 3 displays the 12 ADMP sectors categorized according to the different parameters measured on soils, plants and atmosphere. To get a better visualization, three colors have been used: light grey to represent values below the average, grey for values between this and average plus standard deviation, and black for values up to average plus standard deviation.

A clear difference between southern and northern half of the ADMP can be distinguished: topographic altitude is higher in the South area, decreasing towards the North (Fig. 3). This physiography seems to directly influence the plant biomass, which is higher at the high altitude areas; this is probably due to the creation of a washing area at the North and a soaked area at the South of ADMP. It is important to remark that ADMP is a closed enclosure without drainage, being the lowest topographic point located in the NE corner of the area. Factors affecting this biomass array should be the distribution of water, conditioned by altitude, as well as the presence of higher Hg concentrations topographically below the furnaces locations.

The direct influence of furnaces (B1 and B2 in Fig. 3) is evident in soil LHg, soil DHA and TGM, and indirectly downstream furnaces location on soil THg and soil HAcHg. Soil DHA displays lower values on B1 and B2 sectors and maximum DHA values are located downstream these sectors, on A1 and A2. Runoff water could be an important factor influencing these higher values for total Hg, Hg bound to humic acids and soil DHA on soils samples downstream

the location of the most actives furnaces. Surprisingly, higher THg and Hg bound to humic acids contents do not inhibit enzymatic activity, but it seems to be the opposite; this fact could be due to the inefficient metallurgical activity, producing the deposition of Hg as a compound that easily forms bonds with soil organic matter, and this process does not affect microbial activity. However, soil CbHg concentration appears higher around the most actives furnaces (B1 and B2 sectors on Fig. 3), which may be caused by stockpiling of cinnabar ore nearby the furnaces position during their activity. Other parameters seem to be influenced by anthropogenic factors, such as the presence of a barn in B3 sector, that produces an important increment on the concentration of SOM at this sector, or an uncontrolled rubbish dump located near the southern sectors, which can provide an explanation to the distribution of EC values, decreasing from South to the North. Finally, other datasets, such as soil reactivity, may be caused by unknown factors probably not linked with the distribution of Hg.

### 3.2. Relationship between parameters

Soil-plant-atmosphere system on ADMP probably has many factors involved on Hg transfer between environmental compartments. Most of them were considered in this work, especially those affecting the characterization of soils (total Hg, leachable Hg, Hg thermal speciation data, pH, organic matter content, electric conductivity, DHA), plants (total Hg, Hg thermal speciation data, biomass weight and height) and atmosphere (total gaseous Hg). A correlation study was performed in order to check the relationships between pairs of measured data (Table 2). This study has found significant correlation between total Hg in soil, considering data from different surveys (2008–2011) vs. the samples considered in this study, assuring that sampling design and number of samples show representativeness enough as to be comparable with previous studies. Another important relationship in soil compartment

**Table 2**Correlation matrix of main parameters of soil-plant-atmosphere system in ADMP. Significant correlation ( $p < 0.01$ ) appears in bold.

	Soil THg UCLM	Soil THg	Soil LHg	Soil AcHHg	Soil CbHg	Soil OM	Soil EC	Soil pH	DHA	Plant THg	Biomass	Plant OMHg
Soil THg	<b>0.905</b>											
Soil LHg	0.478	0.258										
Soil AcHHg	<b>0.791</b>	<b>0.791</b>	<b>0.651</b>									
Soil CbHg	<b>0.648</b>	<b>0.785</b>	−0.227	0.243								
Soil OM	0.359	0.354	0.026	−0.003	0.574							
Soil EC	−0.454	−0.283	−0.476	−0.327	−0.143	−0.105						
Soil pH	−0.013	0.030	0.202	0.031	0.013	0.126	0.574					
DHA	0.408	0.540	−0.134	0.318	0.530	0.117	0.390	0.322				
Plant THg	0.374	0.321	−0.114	0.320	0.177	−0.331	−0.304	−0.467	−0.127			
Biomass	−0.216	0.091	−0.353	−0.110	0.244	0.210	0.506	0.212	0.475	−0.496		
Plant OMHg	0.243	0.194	−0.078	0.278	0.020	−0.471	−0.296	−0.481	−0.220	<b>0.972</b>	−0.461	
Plant CbHg	0.452	0.396	−0.138	0.335	0.281	−0.221	−0.297	−0.441	−0.058	<b>0.986</b>	−0.504	<b>0.919</b>

was found between total Hg content (THg) and fractions identified by thermal speciation (Hg bound to humic acids and cinnabar). This association possibly represents that the fractionation of Hg compounds in ADMP soils could be a unique process independent of the relative position of each sample, the organic matter content or the enzymatic activity. However, this association should be strongly dependent on the distribution of furnaces and cinnabar stockpiles in the ADMP. Besides this, another slightly weaker association ( $R^2 = 0.6$ ) has been found between leachable Hg and Hg bound to humic acid fractions of soil.

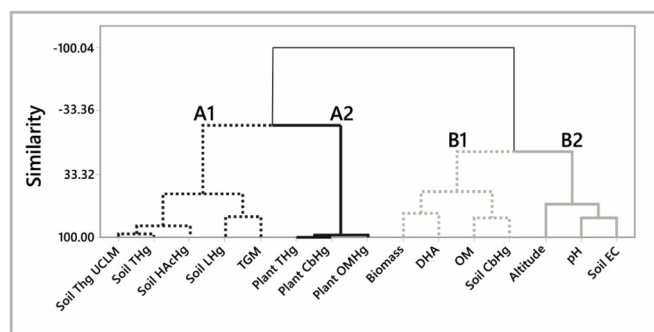
Additionally, another association was found between Hg fractions and total Hg in plants, reflecting the same factor/s involved in Hg uptake process or ulterior Hg transformations once in plants tissues. This relationship is stronger ( $R^2 = 0.9$ ) than in soil speciation data ( $R^2 = 0.7$ ), putting in evidence a simpler process for plant species distribution than for soil species distribution.

The study of multiple relationships between all considered parameters, based on cluster analysis, offers a closest view over this process, separating two groups of factors (Fig. 4): one clustering most of Hg data from soil, plant or atmosphere; and a second one clustering several factors like biomass, DHA, topographic level, and pedological characterization of soil. It is important to remark that this assumption implies that Hg presence in soils and plants does not act as factors influencing biomass or microbial activity, as it could be expected. Conversely, factors like physiography, SOM contents or soil reactivity do not have influence on Hg contents of soils and plants. Looking more closely to the first group (Fig. 4) highlights the important separation between Hg data in soil/atmosphere and in plants: in the first subgroup, soil total Hg contents appear clearly related with Hg bound to humic acid, while leachable fraction appears linked with TGM. This is coherent with the relationship of Hg emission flux in soils and soluble Hg compounds previously described by Llanos et al. (2012) in samples taken from the same location.

### 3.3. Does mercury presence in soils promote their microbial activity?

This work offers a complete overview of one of the most polluted sites in the world, the Almadenejos decommissioned metallurgical precinct. The main characteristics of this enclosure includes the total isolation of water and leachates by a 3-m-high wall, and a slightly sloping surface (~8%) from South to North. In this context, four active furnaces on sectors B1 and B2 (Fig. 2) produce the dissemination of Hg to the surrounding soils, more concentrated in the area located downstream of these four furnaces. Stockpiling of cinnabar around the furnaces produced a halo of cinnabar pollution, while metallurgical activity produced higher leachable Hg contents in sectors B1–B2. The emissions of Hg to the atmosphere are higher on the ruins of furnace buildings than in polluted soils, as it can be observed in TGM contents measured in the ADMP (Martínez-Coronado et al., 2011). But what is the real influence on ADMP environment of the presence of Hg in soils and air? Plant biomass seems to be affected, decreasing its values in northern sectors, where leachates arrive, while plant Hg uptake appears to be maximum in the surrounding areas of furnaces. Conversely, the distribution of DHA shows evidence that Hg enhances more than inhibits microbial activity. For instance, nearby soils located on a Pb–Zn abandoned mine (San Quintin mine), located some 38 km NE of ADMP, show DHA levels on local agro-economic soils of  $740 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$  (olives) and  $370 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$  (rainfed cultivation), very close figures to DHA levels in ADMP ( $270\text{--}900 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$ ). Conversely, polluted soils with high Pb and Zn concentrations and low pH show extremely low DHA levels, below  $10 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$  (Zamorano, 2017), evidencing the influence of heavy metals and acid mine drainage on DHA values.

Other comparison point could be the soils from Aznalcollar (Seville), a location where a spill of pyrite-rich sludge caused a great environmental problem downstream (Hinojosa et al. (2004). These authors found that DHA values in polluted soils from this area were  $70 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$ , while non-polluted soils reached  $1700\text{--}1270 \mu\text{g TPF g}^{-1}\text{day}^{-1}$ . Then, our results indicate that ADMP soils are more similar in terms of microbiological activity to non-polluted soils category. Various factors can be playing an important role on these differences on DHA values between Pb–Zn mines and Hg mines. Sulfide mines commonly produce acid mine drainage (AMD), acidifying soils and increasing salinity values in the surrounding of the working areas. In the case study of Aznalcollar spill, changes in pH and presence of heavy metals were the main factors inhibiting microbial activity (Hinojosa et al., 2004), because low pH can cause changes in the composition of microbial communities and, as a result of this, the enzymatic dynamic changes (Killam, 1994). Presence of heavy metals in the soils inhibits enzyme activity, reacting with sulfide groups and causing



**Fig. 4.** Dendrogram of main factors involved in mercury uptake by plants in ADMP including all factors (A) and only mercury data of all environmental compartments (B).

inactivation or inhibition of enzyme activity, and this assertion has been probed for Cu, Cd and Zn in Aznalcollar and for Pb and Zn in San Quintin. However, the scenario in ADMP is quite different, without AMD, with soil reactivity almost neutral and with a considerable livestock activity, which provides abundant organic matter to the studied soils. Other factors can play an important role in ADMP Hg cycle, especially the inefficient metallurgical devices (Bustamante furnaces) present on this facility; thus, using isotopic tracers it has been probed that methylation rates in ADMP furnaces were unusually high compared with other mining sites worldwide (Gray et al., 2004). The reason was most probably in the highly elevated proportion of  $\text{Hg}^{2+}$  in ADMP calcines, surely sub-product of the inefficient roasting of cinnabar that produces high concentrations of  $\text{Hg}^0$  in soils, which later suffers an oxidation to form  $\text{Hg}^{2+}$ . Another possible origin for this  $\text{Hg}^{2+}$  is the direct deposition from the atmosphere. In any case, this  $\text{Hg}^{2+}$  makes net methylation rate 5000 times higher than in anywhere else site of AMMD. Furthermore, considering that soil ambient is usually oxidant, methylating bacteria should be inactive during dry seasons and should act as a highly effective methylation agent during warm seasons. The high bacterial activity found on this work in ADMP explains this high methylation rates described by Gray et al. (2004). Probably the main difference is that Hg does not act as a toxin for microbial diversity, nor as a necessity for bacterial activity.

#### 4. Conclusions

- For the first time, a complete description of total Hg and its speciation fractions in soils and plants has been performed on a highly polluted area. Total Hg contents in the local soils represent the highest Hg data found in all AMMD, with a fractionation of 48% Hg bound to humic acids and 52% as cinnabar. Plants exhibit also high Hg contents, with bioconcentration factors ( $\text{Plant}_{\text{OMHg}}/\text{Soil}_{\text{AcHg}}$ ) much lower than unity. The fractionation between Hg bound to plant organic matter and cinnabar is 40%–60%.
- Significant correlations have been found between soil Hg fractions (total, bound to humic acids, cinnabar and leachable) and between Hg fractions in plants (total, bound to organic matter and cinnabar). Soil conditions seem not to be related with Hg transfer from soils to plants.
- A statistical multivariate analysis shows that soil parameters (pH, electric conductivity) and biological productivity data (biomass and DHA) appear as non-related with Hg fractionation in soils and plants.
- The main factors explaining the distribution of Hg in soils, plants and atmosphere in ADMP are the location of furnaces and the water distribution inside the isolated metallurgical precinct.
- As main conclusion, biomass data and DHA levels indicate that the studied area is not affected by the expected pollution effects induced by the presence of a toxic metal.
- Further research is needed aimed to obtain information about the dynamics of bacterial activity through annual seasons, in order to establish differences between different meteorological conditions.

#### References

Amorós, J.A., Esbrí, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez de los Reyes, C., Bravo, S., Villaseñor, B., Higuera, P., 2014. Variations in mercury and other trace elements contents in vines leaves from the Almadén Hg-mining district. *J. Soils Sediments* 14, 773–777.

ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Mercury. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46-p.pdf>.

Barajas, M., 2008. Ensayos de metabolismo microbiano en suelo: actividad deshidrogenasa y tasa de mineralización del nitrógeno. In: Ramírez, P., Mendoza, A.

(Eds.), Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Inst. Nac. de Ecol. México.

Barquero, J.L., Rojas, S., Esbrí, J.M., García-Noguero, E., Higuera, P., 2017. Factors influencing mercury uptake by leaves of stone pine (*Pinus pinea* L.) in Almadén (Central Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0446-8>.

Biester, H., Scholz, C., 1997. Determination of mercury binding forms in contaminated soils: mercury pyrolysis versus sequential extractions. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1), 233–239.

Carrasco-Gil, S., Siebner, H., Leduc, D.L., Webb, S.M., Millán, R., Andrews, J.C., Hernández, L.E., 2013. Mercury localization and speciation in plants grown hydroponically or in a natural environment. *Environ. Sci. Technol.* 47 (7), 3082–3090.

Casida, L.E., 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 630–636.

Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98, 371–376.

Dago, A., González, I., Ariño, C., Martínez-Coronado, A., Higuera, P., Díaz-Cruz, J.M., Esteban, M., 2014. Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district by analysis of phytochelators and their Hg complexes. *Environ. Sci. Technol.* 48 (11), 6256–6263.

Esbrí, J.M., Martínez-Coronado, A., Higuera, P., 2016. Temporal variations in gaseous elemental mercury concentrations at a contaminated site: main factors affecting nocturnal maxima in daily cycles. *Atmos. Environ.* 125, 8–14.

Gray, J.E., Hines, M.E., Higuera, P.L., Adatto, I., Lasorsa, B.K., 2004. Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén Mining district, Spain. *Environ. Sci. Technol.* 38 (16), 4285–4292.

Grigal, D.F., 2003. Mercury sequestration in forest and soils: a review. *J. Environ. Qual.* 32, 393–405.

Gu, Y., Wag, P., Kong, C., 2009. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soils influenced by allelopathic rice variety. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 436–441.

Hernández, A., Jébrak, M., Higuera, P., Oyarzun, R., Morata, D., Munhá, J., 1999. The Almadén mercury mining district, Spain. *Miner. Deposita* 34, 539–548.

Higuera, P., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez de los Reyes, C., Moreno, G., 2012. Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *J. Geochem. Explor.* 123, 143–151.

Higuera, P.L., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., Pérez de los Reyes, C., López-Berdonces, M.A., García-Navarro, F.J., 2016. Mercury transfer from soil to olive trees. A comparison of three different contaminated sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6055–6061.

Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruiz, R., Dick, R.P., 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biol. Biochem.* 36 (10), 1559–1568.

IGME, 2012. In: Geoquímica de España, Atlas (Ed.), Juan Locutura. IGME, Madrid, p. 592.

Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. Trace Elements from Soil to Human. Springer-Verlag, Berlin.

Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C., Kizilkaya, R., 2011. Soil enzymes as indication of soil quality. In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), Soil Enzymology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 119–148.

Killam, K., 1994. Soil Ecology. Cambridge Press, New York, pp. 24–28, 1994.

Llanos, W., Kocman, D., Higuera, P., Horvat, M., 2012. Mercury emission and dispersion models from soils contaminated by cinnabar mining and metallurgy. *J. Environ. Monit.* 13 (12), 3460–3468.

Martínez-Coronado, A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Llanos, W., Higuera, P., 2011. Sampling high to extremely high Hg concentrations at the Cerco de Almadenejos, Almadén mining district (Spain): the old metallurgical precinct (1794 to 1861 AD) and surrounding areas. *J. Geochem. Explor.* 109, 70–77.

Meier, S., Curaqueo, G., Khan, N., Bolan, N., Rilling, J., Vidal, C., Borie, F., 2017. Effects of biochar on copper immobilization and soil microbial communities in a metal-contaminated soil. *J. Soils Sediments* 17 (5), 1237–1250.

Millán, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Carrasco-Gil, S., Villadóniga, M., Rico, C., Ledesma, D.M.S., Puente, F.J.D., 2011. Spatial variation of biological and pedological properties in an area affected by a metallurgical mercury plant: Almadenejos (Spain). *Appl. Geochem.* 26 (2), 174–181.

Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Quejido, A.J., Sánchez, D.M., Cardona, A.I., Fernández, M., Vera, R., 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Sci. Total Environ.* 368 (1), 79–87.

Millán, R., Sierra, M.J., Schmid, T., Carrasco Gil, S., Sánchez Ledesma, D.M., Díaz Puente, F.J., 2013. Mercury distribution in an abandoned metallurgical plant. In: Paper Presented at the E3S Web of Conferences, vol. 1. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20130110005>.

Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P., 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* 28 (5), 487–498.

Montejo, M., Torres, C.P., Martínez, A., Tenorio, J.A., Cruz, M.R., Ramos, F.R., Cuevas, M.C., 2012. Técnicas para el análisis de actividad enzimática en suelos. In: Cuevas, M.C., Espinosa, G., Ilizaliturri, C., Mendoza, A. (Eds.), Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. INECC, México.

Mukhopadhyay, S., Maiti, S.K., 2010. Dehydrogenase activity in natural and mine soil - a review. *Indian J. Environ. Prot.* 30 (11), 921–933.

- Obrist, D., 2012. Mercury distribution across 14 U.S. forests. Part II: patterns of methyl mercury concentrations and areal mass of total and methyl mercury. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5921–5930.
- Pan, J., Yu, L., 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecol. Eng.* 37, 1889–1894.
- Parks, J.M., Johs, A., Podar, M., ..., Elias, D.A., Liang, L., 2013. The genetic basis for bacterial mercury methylation. *Science* 339 (6125), 1332–1335.
- Patra, M., Sharma, A., 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot. Rev.* 66, 379–422.
- Pellegrini, E., Petranich, E., Acquavita, A., Canário, J., Emili, A., Covelli, S., 2017. Mercury uptake by halophytes in response to a long-term contamination in coastal wetland salt marshes (northern Adriatic Sea). *Environ. Geochem. Health* 39 (Issue 6), 1273–1289.
- Rao, M.V., Dubey, S.P., 1992. Occurrence of heavy metals in air and their accumulation by tropical plants growing around an industrial area. *Sci. Total Environ.* 126, 1–16.
- Rumayor, M., Lopez-Anton, M.A., Díaz-Somoano, M., Maroto-Valer, M.M., Richard, J.-., Biester, H., Martínez-Tarazona, M.R., 2016. A comparison of devices using thermal desorption for mercury speciation in solids. *Talanta* 150, 272–277.
- Schlüter, K., 1993. Soil and Groundwater Research Report IV. The Fate of Mercury in Soil: a Review of Current Knowledge. European Commission, Brussels.
- Shahzad, S.M., Arif, M.S., Riaz, M., Ashraf, M., Yasmeen, T., Zaheer, A., Robroek, B.J.M., 2017. Interaction of compost additives with phosphate solubilizing rhizobacteria improved maize production and soil biochemical properties under dryland agriculture. *Soil Tillage Res.* 174, 70–80.
- Sholupov, S., Pogarev, S., Ryzhov, V., Mashyanov, N., Stroganov, A., 2004. Zeeman atomic absorption spectrometer RA-915+ for direct determination of mercury in air and complex matrix samples. *Fuel Process. Technol.* 85 (6–7), 473–485.
- Skyllberg, U., Qian, J., Frech, W., Xia, K., Bleam, W.F., 2003. Distribution of mercury, methyl mercury and organic sulphur species in soil, soil solution and stream of a boreal forest catchment. *Biogeochemistry* 64, 53–76.
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S., 2009. Nonstomatal versus stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environ. Sci. Technol.* 43 (5), 1367–1372.
- Steinnes, E., 1995. Mercury. In: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, second ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Tejero, J., Higuera, P., Esbrí, J.M., Garrido, I., Oyarzun, R., Español, S., 2015. An estimation of mercury concentrations in the local atmosphere of Almadén (Ciudad Real Province, South-Central Spain) during the 20<sup>th</sup> Century. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4833–4841.
- Ulrich, R., Raszyk, J., Nápravník, A., 2001. Variations in contamination by mercury, cadmium and lead on swine farms in the district of Hodonín in 1994 to 1999. *Veterinarni Med.* 46 (5), 132–139.
- USDA, 1996. The soil survey analytical continuum. In: *Soil Survey Laboratory Methods Manual*. Soil Survey Investigation Report N° 42. NSSC.
- USEPA, 1997. Mercury Study: Report to Congress. Available at: <https://www.epa.gov/mercury/mercury-study-report-congress>. Last access on 03-09-2017.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–38.
- Watts, D.B., Torbert, H.A., Feng, Y., Prior, S.A., 2010. Soil microbial community dynamics as influenced by composted dairy manure, soil properties, and landscape position. *Soil Sci.* 175, 474–486.
- Wolinska, A., Stepniewska, Z., 2012. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: Canuto, R.A. (Ed.), *Dehydrogenases*. Intech, Rijeka. Available at: <http://www.ebook3000.com/>.
- Zamorano, P., 2017. Variación superficial de la actividad microbiana en suelos afectados por la actividad minera (Graduation dissertation). ETSIACR (UCLM) (Available via the authors).



### **Anexo C.**

Naharro, R.; Esbri, J.M.; Amorós, J.A.; Higuera, P. (en revisión). Experimental assessment of the daily exchange of atmospheric mercury in *Epipremnum aureum*. Enviado a *Environmental geochemistry and Health* en septiembre de 2019.

**Experimental assessment of the daily exchange of atmospheric mercury in  
*Epipremnum aureum*.**

Rocio Naharro<sup>1,2</sup>, José María Esbrí<sup>1</sup>, José Angel Amorós<sup>2</sup> and Pablo Higuera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Geología Aplicada, Escuela de Ingeniería Minera e Industrial de Almadén,  
Universidad de Castilla-La Mancha, Plaza M. Meca 1, Almadén, Ciudad Real 13400,  
Spain

<sup>2</sup>Instituto de Geología Aplicada, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de  
Ciudad Real, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

Corresponding author: José M<sup>a</sup> Esbrí ([josemaria.esbri@uclm.es](mailto:josemaria.esbri@uclm.es)). EIMIA, Plaza Manuel  
Meca, 1. 13400-Almadén (Ciudad Real-Spain)

José María Esbrí ORCID: 0000-0001-8530-6057

José Angel Amorós ORCID: 0000-0002-7507-9724

Pablo L. Higuera ORCID: 0000-0002-3662-7302

**Abstract**

Mercury (Hg) exchange at the plant leaf-atmosphere interface is an important issue when considering vegetation as a sink or source of this global pollutant. The aim of the study described here was to clarify this process by studying Hg exchange under laboratory conditions with a plant model, namely *Epipremnum aureum*. The desorption and absorption processes were studied under similar conditions in natural daylight. Hg exchange was measured at the foliar surface and micrometeorological parameters and stomatal conductance were assessed. The results of the Hg exchange study showed

different rhythms for the two processes, i.e., desorption ( $14\text{--}196\text{ ng m}^{-2}\text{ d}^{-1}$ ) was slower than absorption ( $170\text{--}1341\text{ ng m}^{-2}\text{ d}^{-1}$ ). The daily cycle was more complex in the desorption process, with a maximum when stomatal conductance was high but also with high values during nocturnal hours and a trend to absorption in the mornings. The daily absorption cycles were relatively simple, with values that coincided with positive stomatal conductance values and null values during nocturnal hours. The main factors involved in desorption were stomatal conductance and temperature, but other factors may need to be considered. The absorption process only involved total gaseous Hg, stomatal conductance and relative humidity. A net balance of the two experiments provided data on the amount of Hg transferred per unit leaf area ( $167\text{ ng m}^{-2}$  for desorption and  $9213\text{ ng m}^{-2}$  for absorption), which implies total amounts of 23 ng of Hg desorbed and 1280 ng absorbed during the whole experiment. Finally, the reversible/non-reversible nature of the Hg exchange process must be reconsidered bearing in mind that Hg within the leaf can be emitted if changes in ambient conditions are appropriate to favour this process.

**Keywords.** Mercury, plant-atmosphere, stomatal conductance, *Epipremnum aureum*, gas exchange.

## 1. Introduction and background

Mercury (Hg) is an element that is present in the environment and it exists in the three states of matter: liquid (rarely), solid and gas. The ability to transform this element from the solid or liquid to the gaseous state leads to very complex global cycling processes, in which the important aspects to consider are flows between different environmental compartments (terrestrial, freshwater, oceans and atmosphere) and transformations from one state to another (Beckers and Rinklebe, 2017). Once Hg has been emitted by a source, either anthropogenic or natural, it undergoes transformations between  $\text{Hg}^0$ – $\text{Hg}^{2+}$ –Particulate Hg in the atmosphere, or between  $\text{Hg}^0$ – $\text{Hg}^{2+}$ – $\text{MeHg}^+$  in terrestrial or aquatic environments. In the terrestrial environment these Hg compounds are preferentially found in soils, bound to organic matter, as a product of atmospheric deposition (Si and Ariya, 2018). Vegetation plays an important role in the Hg exchange process between the soil and the atmosphere, with Hg acquired from the soil via the roots (Liu et al., 2017; Ahammad et al. 2018) and from the atmosphere via the leaves (Kowalski & Frankowski, 2016; Zheng et al., 2017; Barquero et al., 2019).

Plants act as a temporary sink for Hg and they provide a transfer pathway from the soil to the atmosphere or from the atmosphere to the soil via litterfall. It has been established in numerous studies that direct Hg uptake by plants from the soil is minor compared to the Hg emission/deposition direct from the atmosphere (Assad et al., 2016; Kowalski and Frankowski, 2016; Zheng et al., 2017; Higuera et al., 2016; Barquero et al., 2018 and Esbrí et al., 2018). A great deal of effort has been devoted to clarifying gaseous elemental Hg (GEM) fluxes from the soil to the atmosphere, with a global cycle of net emissions reported in warm seasons and negligible flux in colder periods (Sommar et al., 2012; Demers et al., 2013). In terrestrial ecosystems it is necessary to consider the vegetation given that it can act as a source or sink depending on the micrometeorological conditions

and plant community composition (Molina et al., 2006; Campos et al., 2018; Bash and Miller, 2007; Converse et al., 2010; Higuera et al., 2012; Amorós et al., 2014). Eckley et al. (2016) found that vegetation seems to have an impact on soil-atmosphere Hg fluxes due to a reduction in solar radiation reaching the soil and to the direct uptake of Hg emitted by the soil. However, this direct uptake involves a continuous exchange of Hg and it is necessary to clarify the cycling of Hg fluxes. The approaches employed to make these canopy flux measurements include micrometeorological methods (mainly Bowen and Eddy covariance monitoring stations) to monitor a complete forest mass (Yu et al., 2018), the use of a dynamic flux chamber to study the flux of a plant specimen in situ (Fu et al., 2010; Milohollen et al., 2006) and controlled conditions in the laboratory (Stamenkovic and Gustin, 2009).

Obrist et al. (2012) stated that Hg flux at the terrestrial-atmosphere interface is not well understood, especially when factors like the absence of GEM (background areas) or the existence of vegetation have a relevant impact in the area of study. Plants represent the dominant pathway for Hg deposition in these environments, mainly due to litterfall but also as a result of throughfall, with 70–85% of total Hg deposition reached in a forest environment (Wang et al., 2016). Litterfall can be enriched in Hg direct from the atmosphere by wet deposition (Zheng et al. 2016) or dry deposition (Witt et al., 2009) but, surprisingly, most of the Hg in litterfall comes from woody biomass – at a level of some 70% – and not from foliage (Obrist et al. 2018; Yang et al. 2017). The acquisition pathway for this Hg in plant tissue (wood and leaves) is mostly atmospheric and occurs by two routes, namely through the stomata in leaves and through cuticle/cortex in the leaves/trunk. Some authors have estimated that Hg acquisition via stomata or the cuticle can lead to differences in reversibility, but this is not well established. Stamenkovic and Gustin (2009) estimated that Hg leaf uptake has both a reversible and a non-reversible

component depending on the acquisition route, thus implying the oxidation of  $\text{Hg}^0$  taken up by the leaf. Rutter et al. (2011) estimated that 96% of Hg uptake goes to the interior of the leaf and this involves both the exchangeable Hg fraction and the non-exchangeable fraction. These conclusions were confirmed by Naharro et al. (2018), who estimated that non-reversible exchange is the minor component for olive trees in a Hg contaminated site.

The objective of the study reported here was to evaluate the daily Hg cycle in plants in contrasting situations of Hg absorption/desorption. The aim was to estimate the proportions of reversible/non-reversible components in the Hg uptake process. The plant model selected for the acquisition of experimental data was *Epipremnum aureum*. This plant was selected due its ubiquity in tropical environments in Asia and the Pacific islands, the fact that it is a common houseplant around the world, its high foliar surface, its known high Hg uptake capacity and because it has proven to be adapted to high gaseous Hg environments in the 'Instituto de Geología Aplicada' (IGeA) sample storage unit.

## **2. Experimental section**

The experimental design involved the isolation of three branches of *Epipremnum aureum* in a tedlar bag equipped with one inlet line and one outlet line (Figure 1). The tedlar material was chosen because it is the most widely used type of bag for taking samples of gases due to its very low gas permeability and its low capacity to produce cross-contamination problems. Total gaseous Hg in the interior of the bag was monitored by Atomic Fluorescence Spectrometry, using a Tekran 2537B device coupled through the outlet line. A sampling time of 5 minutes and a flow rate of 1 litre per minute were chosen to complete the air renewal in the bag within a short period of time (less than 10 minutes). The volume of air contained in the bag was 8.67 L, as calculated indirectly from the

dimensions of the bag. In order to ensure that the bag was completely inflated during the experiment, a commercial air pump was used to insufflate the same quantity of ambient air as extracted from the bag by the measurement device. Inlet air coming from the room was monitored by Atomic Absorption Spectrometry using a Lumex RA-915M device to ensure analysis of the same air that entered the bag. These two analytical devices have proven to be compatible for the simultaneous measurement of the same phenomenon during an intercomparison analysis conducted in the IGeA laboratory in collaboration with the Carlos III Health Institute, for which the two teams showed a compatibility index (ISO / IEC, 1995) of less than 1 (Fernandez-Patier and Ramos-Diaz, 2011). The quality control of the measurements from the Tekran equipment was confirmed by checking the calibration with an internal permeation source every 3 days and recalibrating every week. The quality control for the Lumex device involved performing a test before each measurement with an internal source of Hg vapour and this monitored the drift of the equipment; this drift was always kept below 3%, although the manufacturer states a deviation of less than 20%.

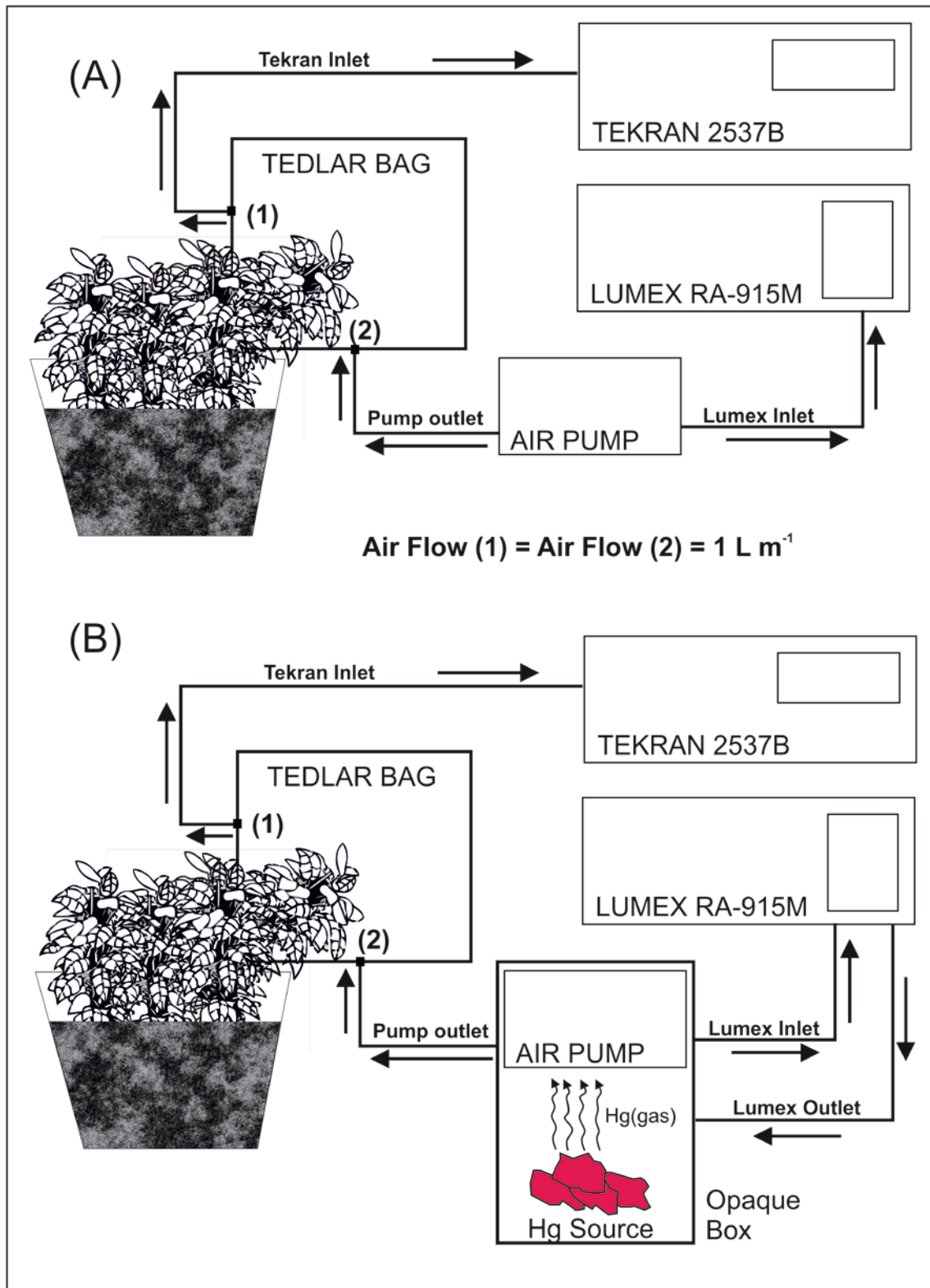


Figure 1. Experimental setup for the desorption (A) and absorption (B) experiments.

Stomatal conductance measurements on *Epipremnum aureum* were performed by means of a leaf steady state diffusion porometer using a Decagon device (model SC-1). Manual measurements were performed hourly for 48 hours, with other plant species included for



comparative purposes (*Plectranthus*, *Begonia acutifolia*, *Begonia coccinea*, *Vitis vinifera*, *Laurus nobilis*, *Citrus sinensis* and *Citrus limon*). Each data point consisted of a single measurement carried out on young and fully developed leaves of the branch and the values are expressed in  $\text{m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Evergreen leaves are usually less effective than deciduous ones in terms of photosynthesis intensity, but in many cases this discrepancy is balanced by their longevity. There is an inverse relationship between the age of the leaf and its photosynthetic activity (Reich et al., 1992) and its capacity to accumulate contaminants (Higueras et al., 2012). The net photosynthesis in woody species ranges from 3 to 12  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and there is a large difference between shade-adapted species and those adapted to sun exposure (15 to 60  $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Cronan, 2018). In order to ensure reproducibility of the measurements, two identical plant specimens (*Begonia acutifolia*) were monitored and similar cycles were obtained ( $R^2 = 0.78$ ), although plants were oriented differently with respect to solar radiation.

Other data acquired during the desorption/absorption experiments were ambient temperature, relative humidity, solar radiation, atmospheric pressure, dew point and evapotranspiration. The measurements were made inside and outside the pump inlet box by portable meters with an EL-USB-2 datalogger (model Lascar), which is capable of storing a large amount of data continuously. Solar radiation, dew point and evapotranspiration were measured using an automatic Davis Vantage Pro micrometeorological station with a console and datalogger for time periods of 15 minutes data storage.

Three branches were introduced into the tedlar bag and the total leaf surface area was 0.139  $\text{m}^2$ , with leaf surface areas of 0.039  $\text{m}^2$ , 0.061  $\text{m}^2$  and 0.039  $\text{m}^2$  for the three branches. Calculation of the leaf surface was performed by 1:1 scale planimetry using the silhouette of the leaves. Signs of leaf damage were not observed during the experiments

and the increment in leaf surface was restricted to 0.002 m<sup>2</sup> due to the natural development of branches with new leaves. Gaseous Hg exchange by the plant was calculated using the following equations:

$$\text{TGM} = \text{TekranHg} - \text{LumexHg}$$

$$\text{BagHg} = \text{TGM} \times \text{Bagvolume}$$

$$\text{ExchangeHg} = \text{BagHg} / \text{leaf surface}$$

Where TGM is the total gaseous Hg concentration expressed in ng m<sup>-3</sup>; TekranHg is the TGM inside the bag measured by the Tekran device, expressed in ng m<sup>-3</sup>; LumexHg is the TGM outside the bag measured by the Lumex device, expressed in ng m<sup>-3</sup>; BagHg is the total amount of TGM in the bag expressed in ng; Bagvolume is the volume of air in the tedlar bag, expressed in m<sup>-3</sup>; and ExchangeHg is the TGM exchange by leaf, expressed in ng m<sup>-2</sup>, in a determined period of time, normally ng m<sup>-2</sup> hour<sup>-1</sup> in daily cycles or ng m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> over the period of the experiment.

Two different experiments were carried out with the *Epipremnum aureum* isolated in the tedlar bag: a desorption experiment from 27<sup>th</sup> April 2018 to 1<sup>st</sup> June 2018 and an absorption experiment from 1<sup>st</sup> June 2018 to 25<sup>th</sup> June 2018. Prior to beginning the desorption experiment, the specimen of *Epipremnum aureum* was maintained in a TGM-rich atmosphere (250 ng m<sup>-3</sup> on average) in a core sample storage unit at the IGeA facility in Almadén (Spain). The exposure time was three months and the THg concentration reached 245 ng g<sup>-1</sup> in leaf (average, wet weight). In this experimental phase the plant was moved from the Almadén IGeA facility to a laboratory in Ciudad Real (Higher Technical School of Agricultural Engineers, 100 km away from Almadén) to be stored under conditions with low atmospheric gaseous Hg (2–3 ng m<sup>-3</sup> in the laboratory). The plant *Epipremnum aureum* was placed in a room in an appropriate orientation with respect to

the window so that it did not receive direct sunlight at any time. The desorption experiment involved monitoring the Hg exchange between leaf and the atmosphere within the bag, without any change in the experimental setup. In contrast, the absorption experiment required some modifications: the main change was the allocation of a gaseous Hg source inside a cardboard box, which was totally opaque, and monitoring with the Lumex equipment. Small pieces of cinnabar samples rich in metallic Hg were placed inside the box as gaseous Hg sources, with an increasing number of samples to increase the TGM concentration inside the tedlar bag (Figure 1). Four experiments were performed, each with a duration of one week; three with natural solar radiation with Hg concentrations inside the bag of 24, 37 and 160 ng m<sup>-3</sup>, respectively, and the last under dark conditions with an Hg concentration inside the bag of 160 ng m<sup>-3</sup>. The concentrations were selected as low, medium and high exposure rates in Almadén city (Esbri et al., 2016).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Stomatal conductance**

The stomatal conductance daily cycle clearly appears to be controlled by the cycle of solar radiation (Figure 2A), with an increase in stomatal conductance from sunrise at 07:00 to a maximum at 10:00, a second moderate increase during the period 14:00–15:00, a slight increase at 20:00 and a decrease with nightfall to zero conductance at 22:00. Daily cycles for other shrub plants (Figure 2B, 2C) showed a similar pattern for two specimens of *Begonia acutifolia*, while the maxima for *Plecthrantus*, *Vitis vinifera* and *Begonia coccifera* were reached later at 13:00 and 17:00. This behaviour – with the maximum in the middle of the day – is coincident with the behaviour of the tree species considered, i.e., *Citrus limon*, *Citrus senensis* and *Laurus nobilis*. A single Pearson correlation study

of the daily cycle of *Epipremnum aureum* with temperature, relative humidity and solar radiation showed the absence of significant correlations, but *Begonia coccifera* gave an  $R^2$  value of 0.70 with relative humidity, *Laurus nobilis* an  $R^2$  of 0.78 with solar radiation and 0.71 with temperature and *Citrus sinensis* an  $R^2$  of 0.71 with temperature. This lack of correlations suggests that the response of stomata to environmental and physiological factors cannot be explained by micrometeorological parameters alone and that some other factors, such as  $\text{CO}_2$  concentration, guard cell and epidermal turgor, may need to be considered (Buckley and Mott., 2002; Mencuccini et al., 2000; Franks et al., 2001).

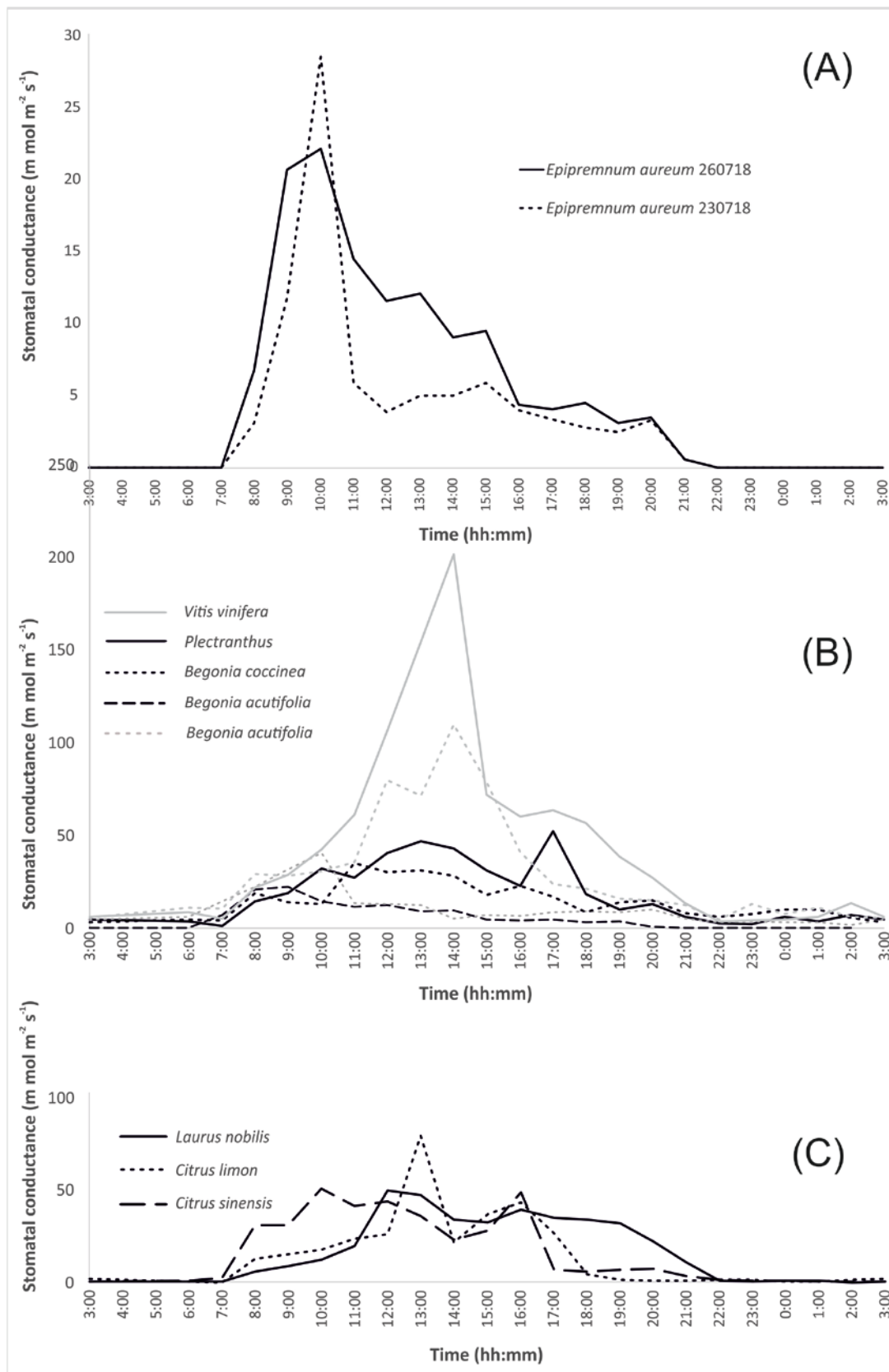


Figure 2. Stomatal conductance daily graph for *Epipremnum aureum* (A) during two cycles of 24 hours and for other common plant species (B) and trees (C) during a cycle of 24 hours.

Stomatal conductance values for *Epipremnum aureum* are in the range 3.7–5.5 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, while all other studied plants showed higher levels (from 10.1 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for *Begonia acutifolia* to 43.5 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for *Vitis vinifera*). These figures are low in comparison to others reported in the recent literature (see Lombardozzi et al., 2017). Segev et al. (2015) provided contrasting data about stomata: the number of stomata per unit leaf surface of *Epipremnum aureum* was the lowest (8), while other plants showed higher values, e.g., *Hedera spp.* (26), *Spinacia oleracea* (13), *Vinca minor* (13) and *Rhododendron spp.* (9). However, *Epipremnum aureum* gave the highest values for other parameters like stomatal index and net rate of photosynthesis. In this context, the low stomatal conductance values found in our study can be explained by the low relative humidity values (33.8% on average) and high ambient temperature (30.4 °C on average) during the experimental period. These two factors are relatively important in all stomatal conductance models (Tuzet et al., 2003).

It should be emphasized that *Epipremnum aureum* was the only plant monitored in this study that showed night values of zero – the other plants gave values below 5 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (*Plecthrantus*, *Begonia coccifera*, *Citrus limon*, *Citrus senensis* and *Laurus nobilis*) or up to 5 m mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (*Begonia acutifolia* and *Vitis vinifera*). This topic has recently gained increasing interest in the scientific literature due to the implications on global climate change and the ability of plants to sequester CO<sub>2</sub> during night-time (Lombardozzi et al., 2017). The stomata of the selected plant species will be completely closed by night, so if leaves uptake/emit Hg at night it will mean that this absorption/desorption should occur through cuticula and not through the photosynthesis apparatus.

### 3.2. Desorption experiment

During the first week (Figure 3A) the general trend was a decrease in desorption, starting from an initial situation in which the emission occurred throughout the day, with a maximum value of  $0.8 \text{ ng m}^{-2} \text{ day}^{-1}$  during the first day and decreasing further in terms of daily desorption to an average of  $0.2 \text{ ng m}^{-2} \text{ day}^{-1}$  on the seventh day. The daily cycle continued to show net desorption as of April 28<sup>th</sup>, although desorption showed a sharp decline towards net absorption between 05:00 and 06:00 and a maximum desorption between 13:30 and 14:30. Watering of the plant on April 30<sup>th</sup> led to a marked increase in relative humidity in the laboratory and a marked decrease in the Hg concentrations both inside and outside the bag, with this change being more pronounced outside the bag.

If we focus on the 29<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> of April (Figure 3B), it can be seen that the daily desorption minimum is now at 05:00–06:00 and the daily desorption maximum is between 13:30–14:30. The effect that irrigation has on the daily maximum is to decrease absorption values, a finding that can be explained in terms of the rise of wet deposition due to the rise in relative humidity in the confined atmosphere of the tedlar bag. On both days there was also a moderate rise in desorption in the period 20:30–22:30. At this time the solar radiation is zero, the photosynthesis process is interrupted, the stomata close and the Hg exchange is falling to zero – even when a temperature drop occurs. These factors are not sufficient to explain the moderate increase in desorption and the trend over the two days is for a decrease; the night-time minimum, the mid-day high and the moderate increase at dusk are lower on April 30<sup>th</sup> when compared to the previous day.

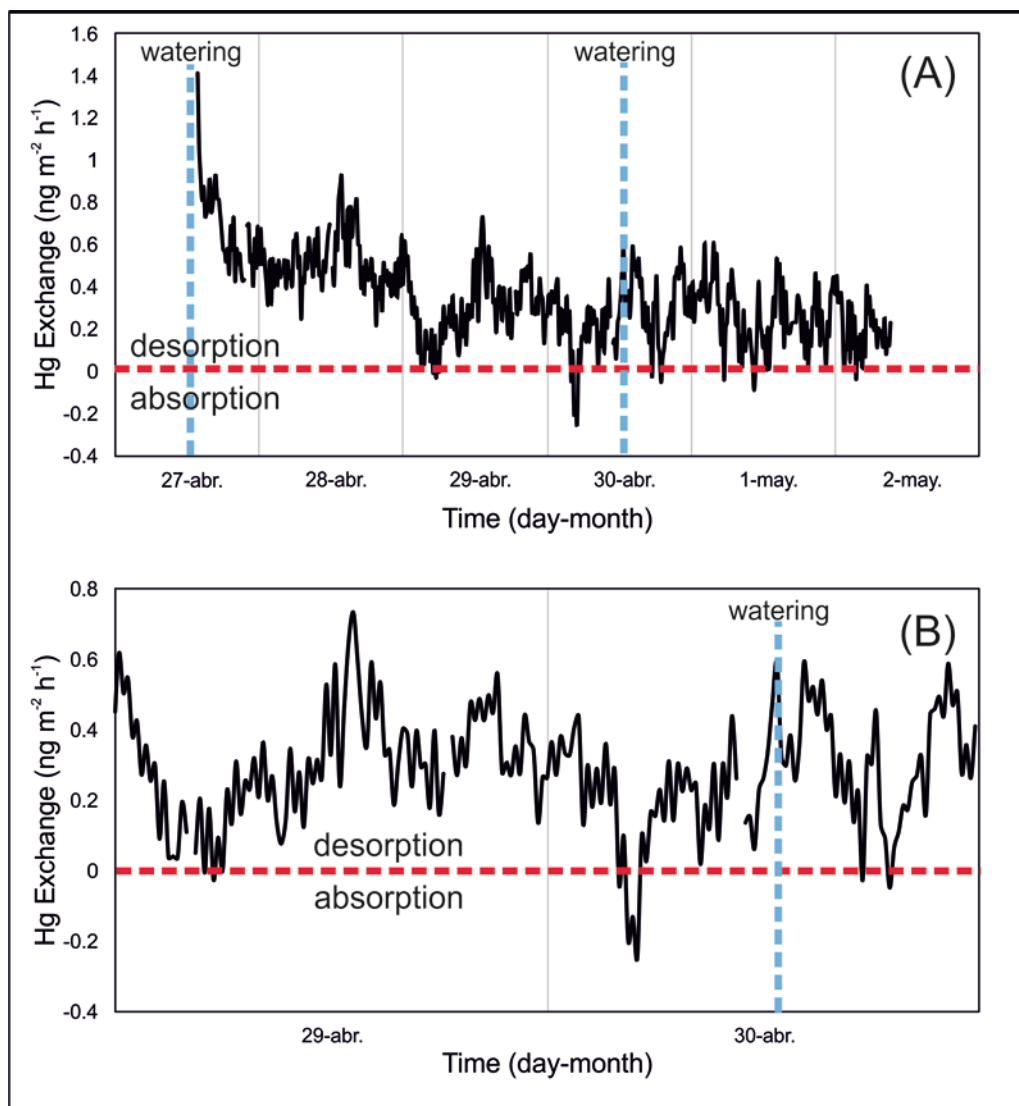


Figure 3. Graphs of Hg flux during the first week of the desorption experiment (A) and a detail of the graph two days after the start of the experiment (B).

During the second week it was observed that ten days after the end of the graph shown in Figure 3B, the desorption pattern and magnitude remained similar (Figure 4A). In this case, the sharp decline occurred in the period 04:00–06:00, the maximum was again recorded in the period 13:30–14:30 and a final increase in desorption was observed at the end of the day, with a maximum in this case in the last hour of the day. The most marked difference on this day was observed in the period 12:00–13:00, which was a sharp decline to net absorption of Hg. The meteorological parameters showed a decrease in the relative humidity and this coincided with the change from desorption to absorption. Relative humidity is involved in the photosynthesis cycle of the plant since the exchange of liquids



is estimated to be greater than the exchange of gases (Beer et al., 2009). Furthermore, it has been reported that very low relative humidity can decrease the respiration rate and even close the stomata to avoid excessive water loss.

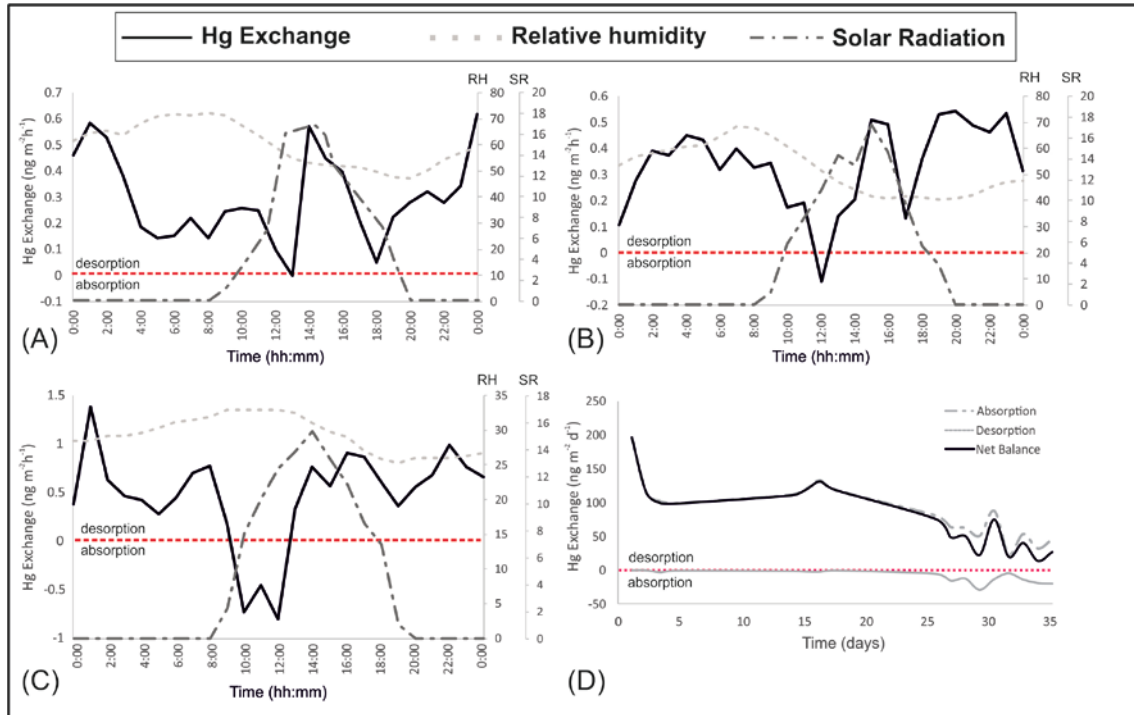


Figure 4. Daily Hg desorption profile 12 days (A), 14 days (B), 26 days (C) after the beginning of the desorption experiment and evolution of Hg flux during the desorption experiment (D). Abbreviations: RH (Relative Humidity) and SR (Solar Radiation). Units: RH (%), SR ( $\text{W m}^{-2}$ ).

The same daily cycle as above can be seen in Figure 4B but with fewer nocturnal variations in relative humidity (and values lower than those shown in Figure 4A) and with similar variations in temperature and irrigation (17:00). It can be seen from the graph that a decrease in desorption at dawn (04:00–06:00) no longer occurs, so it is possible that the predominant factor in this decline was the relative humidity, which was more stable and lower on the night corresponding to the data shown in Figure 4B. However, the decline in desorption during the period 12:00–13:00 continues to occur, with similar conditions of temperature and relative humidity. The maximum in this case again occurs in the period 13:30–14:30 and this coincides with the cycle of solar light in the laboratory, especially

with respect to the decrease in the intensity of solar radiation (the increase in desorption also coincides with the rise in temperature). These findings indicate that the photosynthesis cycle and the stomatal conductance seem to be the main factors that contribute to the observed desorption maximum. The secondary rise at nightfall is more pronounced and higher desorption values are observed, which coincide with irrigation of the plant and the lower relative humidity values in this period. From the observations outlined above, it can be concluded that a lower relative humidity may be a factor that activates the desorption of Hg during the night, both at the beginning and at the end of the day, while the maximum desorption appears to be controlled by the diurnal cycle of sunlight. The peak absorption always coincides with the first few hours of the day, when stomata are open and CO<sub>2</sub> fixation is maximum; besides, in this period absorption is more important than it was 10 days before (Figure 3B).

Over the following ten days (Figure 4C) a marked decrease was observed in the rate of desorption from the leaves of *Epipremnum aureum*, to such an extent that desorption and absorption appeared to be reaching equilibrium. The minimum and maximum trends for the net desorption period (Figure 2) were no longer maintained in this stage of equilibrium: a decline was not observed in the early morning and neither was the maximum at 13:30–14:30, with this time period replaced by a trend towards absorption during the first period of active stomatal conductance and desorption in the second part of the photosynthesis cycle. Before and after the stomata are open, the general trend is towards desorption. This situation is similar to that described by Stamenkovic and Gustin (2009), who explained the episodes of desorption (emission) as being due to the Hg that was adsorbed in the cuticle of the leaf.

The evolution of the desorption and absorption rates over the 35 days of the desorption experiment are represented in Figure 4D. The desorption maximum occurred at the

beginning of the experiment, with zero absorption rates for almost 20 days. In the last phase of the experiment the leaves began reach equilibrium with the Hg in the atmosphere in the bag and a continuous absorption-desorption exchange was established. The lack of gradation or linearity in the decrease in desorption from the beginning of the experiment is remarkable. This phenomenon could be due to a failure in the datalogger, i.e., missing data, which produces two straight lines in the graph that could, in fact, be oscillations like those observed at the end of the graph. The amount of Hg per unit leaf area for the net balance was calculated from this graph and a value of  $167 \text{ ng m}^{-2}$  was obtained, which represents a total amount of 23.21 ng Hg emitted during the whole experiment.

Although a significant linear correlation was not found between Hg exchange and micrometeorological parameters, a multivariate analysis did show a relationship with temperature (72.89 of similitude in a dendrogram with Ward linkage) but not with relative humidity, dew point or solar radiation (similitudes of -30.35).

### 3.3. Absorption experiment

The results of the four absorption experiments are summarised in Figure 5A. The most obvious findings are the absence of desorption periods in a daily cycle and the coincidence of absorption values with stomatal conductance up to zero. Furthermore, it is worth highlighting the marked similarity of the desorption profiles of experiments at low gaseous Hg rates ( $24 \text{ ng m}^{-3}$  and  $37 \text{ ng m}^{-3}$ ) obtained with different Hg vapour sources (metallic Hg for  $24 \text{ ng m}^{-3}$  and cinnabar for  $37 \text{ ng m}^{-3}$ ). The concentration of TGM in the atmosphere in which the plant is kept has been described as a key factor to explain plant Hg uptake. However, the data obtained in this experiment suggest that minor differences in this factor do not influence the Hg acquisition process, so other factors like stomatal conductance rates or  $\text{CO}_2$  concentrations, amongst others, may play important

roles in this process. On the other hand, when plant exposure to Hg reaches very high levels of gaseous Hg ( $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) the profile is significantly wider. These three profiles are very similar in terms of daily evolution, with Hg absorption beginning with the first light of day and the absorption cycle concluding when the solar light cycle ends. It is evident that the photosynthesis cycle of *Epipremnum aureum* (see Figure 2) is the main factor in the distribution of maximum and minimum values in the absorption cycle of the plant, although this is not as clear in terms of the absolute values of absorbed Hg. This relationship is even more evident if one considers the difference between the cycle at  $160 \text{ ng m}^{-3}$  Hg in light and in total darkness. When the plant does not detect sunlight at the beginning of the day, the absorption cycle does not begin but the plant absorbs and desorbs small concentrations at intervals dependent on other factors (temperature, relative humidity, dew point, etc.).

The total amounts of Hg absorbed per unit leaf surface over 24 hours in the four experiments were on average  $269.5 \text{ ng m}^{-2}\text{day}^{-1}$  (TGM =  $24 \text{ ng m}^{-3}$ ),  $352.5 \text{ ng m}^{-2}\text{day}^{-1}$  (TGM =  $37 \text{ ng m}^{-3}$ ),  $1079.6 \text{ ng m}^{-2}\text{day}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) and  $49.2 \text{ ng m}^{-2}\text{day}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) in total darkness. At the end of these four different experiments, Hg plant uptake was estimated to be  $9213 \text{ ng m}^{-2}$ , i.e., a total of 1280 ng for the three branches exposed within the bag.

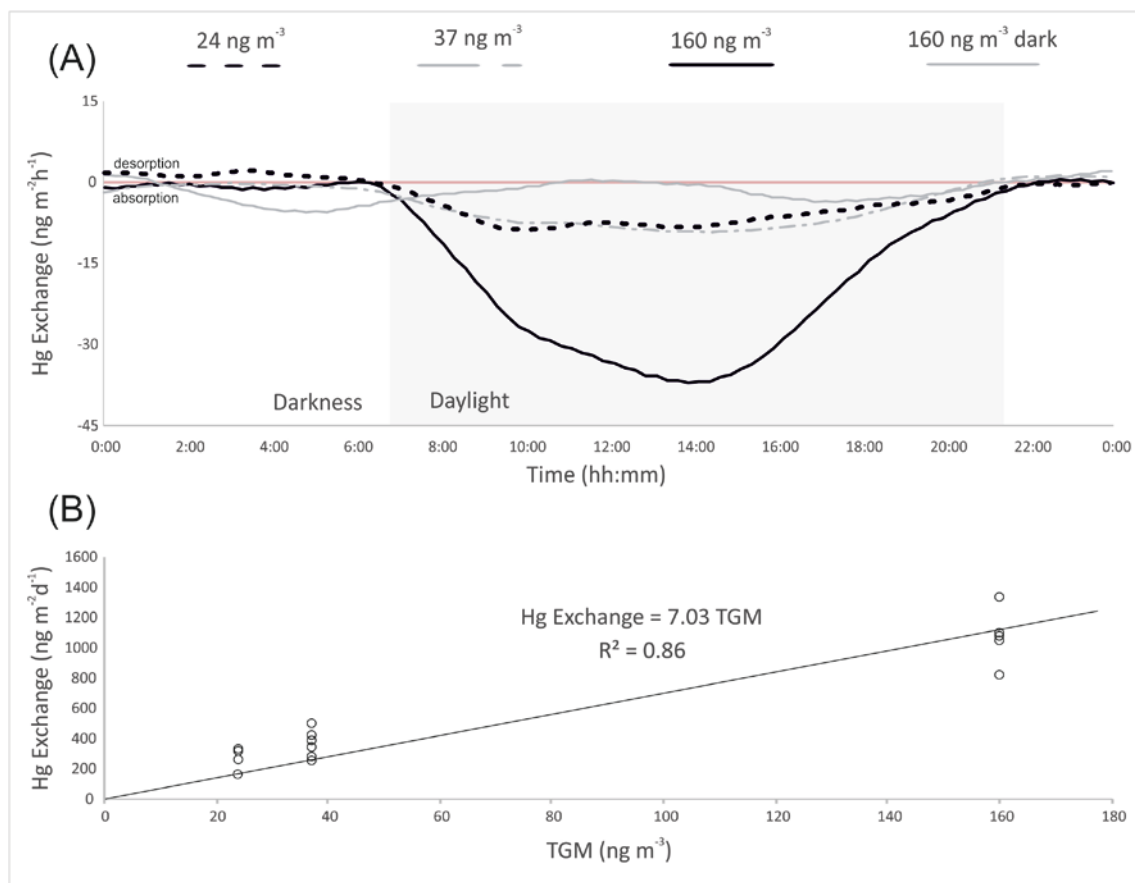


Figure 5. Absorption profiles for *Epipremnum aureum* at different rates of TGM exposure (A) and relationship between TGM inside the bag and Hg uptake by the plant (B).

A significant correlation was found between TGM inside the bag and Hg exchange (a balance of Hg absorbed and emitted) by the plant (Figure 5B). Hg exchange values corresponding to low TGM levels were located above the trend line, which suggests that Hg uptake capacity is higher at low TGM levels and/or Hg uptake capacity has a gradual limitation in relation to increasing TGM levels.

Although a significant linear correlation does not exist between Hg exchange and micrometeorological parameters, a multivariate analysis displayed a weak relationship with relative humidity and dew point (similitude of 46.17 in a dendrogram with Ward linkage) but no relationship with temperature or solar radiation (similitudes of -50.12).

### 3.4. Discussion

*Epipremnum aureum* leaves showed different patterns in the daily desorption-absorption cycles and desorption ( $14\text{--}196\text{ ng m}^{-2}\text{ d}^{-1}$ ) was a slower process than absorption ( $170\text{--}1341\text{ ng m}^{-2}\text{ d}^{-1}$ ). As reported by Stamenkovic and Gustin (2009) for other plant species, the Hg concentration in air has a significant effect on the leaf-atmosphere Hg flux, which increases proportionally with the presence of TGM, from pristine levels in the desorption experiment to higher levels of  $160\text{ ng m}^{-3}$  in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> absorption experiments. Kothny (1973) described for the first time a pulse of Hg emission from vegetation after sunrise, and this idea was confirmed by other authors, who described diurnal net Hg emission frames (Yu et al., 2018; Stamenkovic and Gustin., 2009, amongst others). The work reported here provides the first example of data on the daily desorption cycle after an intense absorption time frame using a common ornamental plant (*Epipremnum aureum*) previously spiked with Hg directly taken up from a naturally enriched atmosphere. These desorption cycles showed maxima that coincided with maximum solar radiation and active stomatal conductance but, surprisingly, showed other minor desorption periods under nocturnal conditions and a tendency to absorption values after sunrise. These cycles appear to be more complex than others described for canopy Hg emission (Yu et al., 2018; Luo et al., 2016), although the photosynthesis cycle was the simplest of all plant factors studied. It is important to note that the data presented here correspond not to emission in a continuous exchange context, but to a desorption under conditions of previous high Hg uptake in leaves and very low TGM in the atmosphere. The existence of nocturnal desorption periods indicates that pathways other than the stomatal route may be acting, thus favouring Hg emission from leaf tissue. Rutter et al. (2011) estimated that Hg uptake goes directly to the interior of the leaf (96%) and only a small quantity (4%) remains in the cuticula of the leaf. These authors considered that 96%

of Hg will remain in the leaf as non-desorbable Hg and only a small quantity (4%) should be emitted to the atmosphere under favourable conditions. It can be seen in Figure 3A that the emission of this surficial Hg can occur in the first stage of the Hg desorption cycle and subsequently the desorbed Hg can come both from the cuticula or from the interior of the leaf, mostly as  $\text{Hg}^0$  but also as  $\text{Hg}^{2+}$ . These data are consistent with previous results reported by Naharro et al. (2018), who stated that almost 37% of Hg previously taken up by olive trees can be desorbed in a pristine area – a proportion higher than the minor fraction described by Rutter et al. (2011). These data limit the non-reversible character of the Hg uptake process and this suggests that a fraction of the ‘immobilized’ Hg in the interior of the leaf could be emitted if TGM levels in the atmosphere decrease dramatically (Naharro et al., 2018). This ‘immobilized’ Hg fraction in the interior of the leaf was not only in an oxidized state but was also metabolized Hg bound to biothiols or proteins (cysteine complexes; Carrasco-Gil et al., 2013). Thus, metabolic processes can liberate these compounds and favour Hg re-emission. For instance, some of these Hg species can be bound to plasma membrane proteins such as aquaporins (Zhang and Tyerman, 1999), they can be involved in water movement between cells, and are susceptible to acting as a transport route for Hg to the exterior of the leaf. Another pathway through which Hg can be emitted involves the fraction bound to phytochelatins or cysteine, which can be involved in long distance metal transport in the interior of the plant, e.g., from root to shoot and vice versa (Gong et al., 2003), and this acts as a mobilising process. The statistical relationship between desorption data and temperature confirms the role of these transport pathways in Hg re-emission. In any case, the exit

route from the leaf during nocturnal periods, in which the stomata are completely closed (as shown in this work), remains unexplained.

On the other hand, the absorption process in *Epipremnum aureum* showed a typical daily cycle for all of the conditions investigated, with Hg uptake varying during daily hours in line with solar radiation and stomatal conductance, and with null Hg flux during nocturnal hours, as reported by other authors for different plant species (Leonard et al., 1998; Ericksen et al., 2003; Stamenkovic and Gustin, 2009). The key factors that affect this absorption process are TGM in the ambient air and stomatal conductance. The first factor acts as a regulator of the proportional uptake capacity, which is higher under low TGM conditions and decreases as TGM levels increase. The implication of this finding is that Hg uptake capacity may tend to a maximum limit depending on the plant species. The second factor is also a limiting one and constitutes the unique pathway through which Hg enters the leaf tissue. Relative humidity could be a secondary factor as TGM levels are modified by wet deposition and stomatal conductance through changes in water equilibria between plant cells and the ambient air. It is important to note that nocturnal absorption was not observed, thus ruling out absorption through cuticula in *Epipremnum aureum*.

The combination of the two processes discussed above, i.e., absorption and desorption in plant species (*Epipremnum aureum*), offers for the first time a complete overview of the possibilities for plants to act as a sink or source of atmospheric Hg if ambient conditions change sufficiently. The absorption process appears to be faster than desorption and this involves stomatal conductance, TGM levels and relative humidity as limiting factors. In contrast, the desorption process seems to be more complex and involves not only stomatal conductance and temperature but also CO<sub>2</sub> concentration, guard cell, epidermal turgor and Hg speciation inside the leaf, amongst other factors. The reversible/non-reversible nature of the process described in the scientific literature must be reconsidered, especially



bearing in mind that Hg in the leaf interior can be emitted if the changes in ambient conditions are sufficient to favour this process. The most important change that can produce this Hg emission is a decline in the TGM level. This effect could be relevant in the context of climate change and the reduction of anthropogenic Hg emissions, for instance, after the reclamation of polluted areas, and it is probably due to the slowing down of the decrease in TGM levels when the desorption rates of vegetation increase as TGM declines.

#### 4. Conclusions

The main findings of the work described above are as follows:

- Stomatal conductance daily cycles differ as a function of plant species, with nocturnal positive values in common plants except for the plant model employed in this study (*Epipremnum aureum*). Absolute stomatal conductance values for *Epipremnum aureum* were in the range  $3.7\text{--}5.5 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , while all other studied plants showed higher levels (from  $10.1 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for *Begonia acutifolia* to  $43.5 \text{ m mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for *Vitis vinifera*).
- Mercury can be desorbed under laboratory conditions at rates of  $14\text{--}196 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  when TGM levels fall to pristine levels, with cycles showing maximum Hg exchange values that coincide with higher stomatal conductance and also during nocturnal hours, but with a tendency towards absorption values during morning hours.
- The absorption of Hg under laboratory conditions reaches values of  $170\text{--}1341 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , with simple cycles of daily absorption periods that coincide with positive stomatal conductance. The total amounts of Hg absorbed per leaf surface in a period of 24 hours were on average  $269.5 \text{ ng m}^{-2} \text{ day}^{-1}$  (TGM =  $24 \text{ ng m}^{-3}$ ),  $352.5$

$\text{ng m}^{-2} \text{day}^{-1}$  (TGM =  $37 \text{ ng m}^{-3}$ ),  $1079.6 \text{ ng m}^{-2} \text{day}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) and  $49.2 \text{ ng m}^{-2} \text{day}^{-1}$  (TGM =  $160 \text{ ng m}^{-3}$ ) in total darkness.

- The absorption process includes factors such as stomatal conductance, TGM level and relative humidity as limiting influences, while the desorption process appears to be more complex and involves not only stomatal conductance and temperature, but also  $\text{CO}_2$  concentration and Hg speciation in the leaf interior, amongst other factors. More research is needed in order to ascertain the role of relative humidity in the exchange process.
- The reversible/non-reversible nature of the Hg uptake process must be reconsidered bearing in mind that Hg in the leaf interior can be emitted if changes in the ambient conditions are sufficient to favour this process.
- The most relevant change in ambient conditions that can promote Hg emission from vegetation is a decline in TGM level. This could be relevant in the context of climate change and the reduction of anthropogenic Hg emissions, with a slowing in the decrease of TGM levels after the reclamation of polluted areas if vegetation increases its desorption rates as TGM declines.

## **Acknowledgements**

This study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (projects CTM2012-33918 and CGL2015-67644-R). The diffusion porometer was provided by the ‘Departamento de Suelo, Planta y Calidad Ambiental’, Spanish Council for Science (CSIC). Dr. Neil Thompson (PhD CChem MRSC) revised the English style.

## References

- Ahammad, S.J., Sumithra, S. Senthilkumar, P. (2018). Mercury uptake and translocation by indigenous plants. *Rasayan Journal of Chemistry*, 11, 1–12.
- Amorós, J., Esbrí, J.M., García-Navarro, F., Pérez-de-los-Reyes, C., Bravo, S., Villaseñor, B., Higuera, P. (2014). Variations in mercury and other trace elements contents in soil and in vine leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 773–777.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M., Tatin-Froux, F. (2016). Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere*, 146, 1–7.
- Barquero, J.I., Rojas, S., Esbrí, J.M., García-Noguero, E.M., Higuera, P. (2019). Factors influencing mercury uptake by leaves of stone pine (*Pinus pinea* L.) in Almadén (Central Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3129–3137.
- Bash, J.O., Miller, D.R. (2007). Growing season total gaseous mercury (TGM) flux measurements over an *Acer rubrum* L. stand. *Atmospheric Environment*, 43, 5953–5961.
- Beckers F, Rinklebe J. (2017). Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. *Crit. Rev. Environmental Science and Technology*, 47, 693–794.
- Beer, C., Ciais, P., Reichstein, M., Baldocchi, D., Law, B.E., Papale, D., Soussana, J.F., Ammann, C., Buchmann, N., Frank, D., Gianelle, D., Janssens, I.A., Knohl, A., Köstner, B., Moors, E., Rouspard, O., Verbeeck, H., Vesala, T., Williams, C.A., Wohlfahrt, G. (2009). Temporal and among-site variability of inherent water use efficiency at the ecosystem level. *Global Biogeochemical Cycles*, 23, 1–13.
- Buckley, T.N., Mott, K.A. 2002. Stomatal water relations and the control of hydraulic supply and demand. *Progress in Botany*, 63, 309–325.
- Campos, J.A., Esbrí, J.M., Madrid, M.M., Naharro, R., Peco, J., García-Noguero, E.M., Amorós, J.A., Moreno, M.M., Higuera, P. (2018). Does mercury presence in soils promote their microbial activity? The Almadenejos case (Almadén mercury mining district, Spain). *Chemosphere*, 201, 799–806.

- Carrasco-Gil, S., Siebner, H., Leduc, D.L., Webb, S.M., Millán, R., Andrews, J.C., Hernández, L.E. (2013). Mercury localization and speciation in plants grown hydroponically or in a natural environment. *Environmental Science and Technology*, 47(7), 3082-3090.
- Converse, A.D., Riscassi, A.L., Scanlon, T.M. (2010). Seasonal variability in gaseous mercury fluxes measured in a high-elevation meadow. *Atmospheric Environment*, 44, 2176–2185.
- Day, M.E. (2000). Influence of temperature and leaf-to-air vapor pressure deficit on net photosynthesis and stomatal conductance in red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiology*, 20, 57-69.
- Demers, J.D., Blum J.D., Zak, D.R. (2013). Mercury isotopes in a forested ecosystem: Implications for air-surface exchange dynamics and the global mercury cycle. *Global Biogeochemical Cycles*, 27, 222–238.
- Eckley, C.S., Tate, M.T., Lin, C., Gustin, M., Dent, S., Eagles-Smith, C., Lutz, M.A., Wickland, K.P., Wang, B., Gray, J.E., Edwards, G.C., Krabbenhoft, D. Smith, D.B. (2016). Surface-air mercury fluxes across western North America: A synthesis of spatial trends and controlling variables. *Science of the Total Environment*, 568, 651-665.
- Ericksen, J.A.; Gustin, M.S., Schorran, D.E., Johnson, D.W., Lindberg, S.E. (2003). Coleman, J. S. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmospheric Environment*, 37, 1613-1622.
- Esbrí, J.M., Cacovean, H., Higuera, P. (2018). Usage Proposal of a common urban decorative tree (*Salix alba* L.) to monitor the dispersion of gaseous mercury: A case study from Turda (Romania). *Chemosphere*, 193, 74–81.
- Fernández-Patier, R., Ramos-Díaz, M.C. (2011). Informe del Ejercicio de Intercomparación de Mercurio Gaseoso total en aire ambiente “INSITU” (año 2011). Ined. Report, Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Área de Contaminación Atmosférica. Ministerio de Economía y Competitividad, España.

- Franks, P.J., Buckley, T.N., Shope, J.C., Mott, K.A. (2001). Guard cell Volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiology*, 125,1577–1584.
- Fu, X., Feng, X., Zhu, W., Rothenberg, S., Yao, H., & Zhang, H. (2010). Elevated atmospheric deposition and dynamics of mercury in a remote upland forest of southwestern china. *Environmental Pollution*, 158(6), 2324-2333.
- Gong, J.M., Lee, D.A., Schroeder, J.I. (2003). Long-distance root-to shoot transport of phytochelatins and cadmium in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 100, 10118–10123.
- Higueras, P., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez-de-los-Reyes, C., Moreno, G. (2012). Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 143-151.
- Higueras, P.L., Amorós, J.Á., Esbrí, J.M., Perez de los Reyes, C., López-Berdonces, M.A., García-Navarro, F.J. (2016). Mercury transfer from soil to olive trees. A comparison of three different contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6055-6061.
- ISO/IEC Guide 431. (1997). Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons Part 1: Development and Operation of Laboratory Proficiency Testing Available at [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=27216](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=27216) (accessed 20.11.18).
- Kothny, E. L. (1973). The three-phase equilibrium of mercury in nature. In Trace Elements in the Environment; Kothny, E. L., Ed., *American Chemical Society*: Washington, DC, pp 48-80.
- Kowalski, A., Frankowski, M. (2016). Seasonal variability of mercury concentrations in soil, buds and leaves of *Tilia platyphyllos* and *Acer platanoides* in central Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 9614–9624.
- Leonard, T.L., Taylor Jr., G.E., Gustin, M.S., Fernandez, G.C.J., 1998. Mercury and plants in contaminated soils: 1. uptake, partitioning, and emission to the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(10), 2063-2071.

- Liu, Z., Wang, L.-., Xu, J., Ding, S., Feng, X. Xiao, H. (2017). Effects of different concentrations of mercury on accumulation of mercury by five plant species. *Ecological Engineering*, 106, 273–278.
- Lombardozzi, D.L., Zeppel, M.J.B., Fisher, R.A., Tawfik, A. (2017). Representing nighttime and minimum conductance in CLM4.5: global hydrology and carbon sensitivity analysis using observational constraints. *Geoscientific Model Development*, 10: 321–331.
- Luo, Y., Duan, L., Driscoll, C. T., Xu, G., Shao, M., Taylor, M., Wang, S., Hao, J. (2016). Foliage/atmosphere exchange of mercury in a subtropical coniferous forest in South China. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 121, 2006–2016,
- Mencuccini, M., Mambelli, S., Comstock, J. (2000). Stomatal responsiveness to leaf water status in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a function of time of day. *Plant Cell and Environment*, 23, 1109–1118.
- Millhollen, A.G., Gustin, M.S., Obrist, D. (2006). Foliar mercury accumulation and exchange for three tree species. *Environmental Science and Technology*, 40(19), 6001-6006.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P. (2006). Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: One of the most contaminated sites on earth. *Environmental Geochemistry and Health*, 28, 487–498.
- Naharro, R., Esbrí, J.M., Amorós, J.A., García-Navarro, F.J., Higuera, P. (2018). Assessment of mercury uptake routes at the soil-plant-atmosphere interface. *Geochemistry, Exploration and Environment*, A, 19(2), 146-154.
- Obrist, D., Johnson, D.W., Edmonds, R.L. (2012). Effects of vegetation type on mercury concentrations and pools in two adjacent coniferous and deciduous forests. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175: 68.
- Obrist, D., Kirk, J.L., Zhang, L., Sunderland, E.M., Jiskra, M., Selin, N.E. (2018). A review of global environmental mercury processes in response to human and natural perturbations: Changes of emissions, climate, and land use. *Ambio* 47:116–140.

- Pérez-de-los-Reyes, C., Amorós, J.A., García Navarro, F.J., Bravo, S., Sánchez, C., Chocano, D., Jiménez-Ballesta, R. (2011). Changes in water retention properties due to the application of sugar foam in red soils. *Agricultural Water Management*, 98, 1834-1839.
- Reich, P.B., Walters, M.B., Elsworth, D.S. (1992). Leaf life span in relation to leaf, plant and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological Monographs*. 62, 365-392.
- Rutter, A.P., Schauer, J.J., Shafer, M.M., Creswell, J.E., Olson, M.R., Robinson, M., Collins, R.M., Parman, A.M., Katzman, T.L. Mallek, J.L. (2011). Dry deposition of gaseous elemental mercury to plants and soils using mercury stable isotopes in a controlled environment. *Atmospheric Environment*, 45(4), 848-855.
- Segev, R., Nannapaneni, R., Sindurakar, P., Kim, H., Read, H., Lijek, S. (2015). The Effect of the Stomatal Index on the Net Rate of Photosynthesis in the Leaves of *Spinacia oleracea*, *Vinca minor*, *Rhododendron spp*, *Epipremnum aureum*, and *Hederaspp* Journal of Emerging Investigators. Available at <https://www.emerginginvestigators.org/articles/the-effect-of-the-stomatal-index-on-the-net-rate-of-photosynthesis-in-the-leaves-of-i-spinacia-oleracea-i-i-vinca-minor-i-i-rhododendron-spp-i-i-epipremnum-aureum-i-and-i-hedera-spp-i> . (accessed 20.11.18).
- Si, L., Ariya, P.A. (2018). Recent advances in atmospheric chemistry of mercury. *Atmosphere*, 9(2), 76.
- Sommar, J., Zhu, W., Lin, C.-J., Feng, X. (2012). Field Approaches to measure Hg exchange between natural surfaces and the atmosphere a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, 1657–1739.
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S. (2009). Nonstomatal vs. stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environmental Science and Technology*, 43, 1367–1372,
- Tuzet, A., Perrierr, A., Leuning, R. (2003). A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant Cell and Environment*, 26, 1097–1116.
- Wang, X., Bao, Z., Lin, C., Yuan, W., Feng, X. (2016). Assessment of global mercury deposition through litterfall. *Environmental Science and Technology*, 50(16), 8548-8557.

- Witt, E. L., Kolka, R. K., Nater, E. A., & Wickman, T. R. (2009). Forest fire effects on mercury deposition in the boreal forest. *Environmental Science and Technology*, 43(6), 1776-1782.
- Yang, Y., Yanaia, R.D., Montesdeoca, M., Driscoll, C.T. (2017). Measuring mercury in wood: Challenging but important. *International Journal of Environment and Analytical Chemistry*, 97, 456.
- Yu, Q., Luo, Y., Wang, S., Wang, Z., Hao, J., Duan, L. (2018). Gaseous elemental mercury (GEM) fluxes over canopy of two typical subtropical forests in south China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18, 495–509.
- Zhang, W.H., Tyerman, S.D. (1999). Inhibition of water channels by HgCl<sub>2</sub> in intact wheat root cells. *Plant Physiology*, 120 (3), 849–857.
- Zheng, W., Obrist, D., Weis, D., Bergquist, B.A. (2016). Mercury isotope compositions across North American forests. *Global Biogeochemical Cycles*, 30, 1475–1492.
- Zheng, S.A., Wu, Z., Chen, C., Liang, J., Huang, H. Zheng, X. (2017). Evaluation of leafy vegetables as bioindicators of gaseous mercury pollution in sewage-irrigated areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 25,413–421.